

**VERGLEICHENDE
UNTERSUCHUNGEN ÜBER
DEN STOFFWECHSEL VON
D(-)-MILCHSÄURE AN
KANINCHEN, RATTE
UND MENSCH**

von
Perdita v. Wallenberg

München 1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551902_0033

Aus dem Institut für Physiologie, Physiologische Chemie
und Ernährungsphysiologie des Fachbereiches Tiermedizin
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. D. Giesecke

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DEN STOFFWECHSEL VON D(-)-MILCHSÄURE
AN KANINCHEN, RATTE UND MENSCH.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereiches Tiermedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Perdita v. Wallenberg
aus Detmold

München 1979

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Kräußlich
Referent: Prof. Dr. D. Giesecke
Korreferent: Prof. Dr. G. Terplan

Tag der Promotion: 27. Juli 1979



Meiner Mutter



INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
1.1. D(-)-2-Hydroxysäuren-Dehydrogenase - Vorkommen, Verbreitung und Charakterisierung	1
1.2. D(-)-Milchsäure als Fermentationsprodukt bei Monogastriern	5
1.3. D(-)-Milchsäure als Bestandteil fermentierter Nahrungsmittel des Menschen	8
1.4. Problemstellung	10
2. MATERIAL UND METHODEN	13
2.1. Durchführung der Tierversuche	13
2.2. Versuchstiere, Haltung und Fütterung	14
2.3. Probengewinnung	15
2.4. Exhalationsradiometrie	16
2.5. Analytische Methoden	17
2.5.1. Enzymatische Bestimmung von Milchsäureisomeren	17
2.5.2. 14-C-Aktivitätsbestimmung im Probenmaterial	18
2.6. Statistische Methoden	18
3. ERGEBNISSE	19
3.1. Versuche zum D(-)-Milchsäurestoffwechsel an Kaninchen	19
3.1.1. Normalkonzentrationen von Milchsäureisomeren im Blut und Magen	19

	Seite
3.1.2. D(-)-Milchsäure im Intermediärstoffwechsel des Kaninchens	20
3.1.3. Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im Harn bei Kaninchen	25
3.1.4. D(-)-Milchsäurestoffwechsel im Magen unter Einfluß von Caecotrophe	29
3.1.5. Einfluß der Caecotrophe auf die Oxidation von D(-)-Milchsäure. Versuche in vivo	35
3.2. Versuche zum D(-)-Milchsäurestoffwechsel an Ratten	41
3.2.1. Normalkonzentrationen von Milchsäureisomeren im Magen und Blut	41
3.2.2. Oxidation von D(-)-Milchsäure nach hoher peroraler Dosierung	43
3.2.3. Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im Harn	50
3.3. Versuche zur renalen D(-)-Milchsäureausscheidung beim Mensch	52
3.3.1. Ausscheidung von D(-)-Milchsäure über den Harn nach peroraler Dosierung	52
4. DISKUSSION	57
4.1. Physiologische Milchsäurebildung im Magen	57
4.2. Metabolisierung von D(-)-Lactat	60
4.3. Renale Ausscheidung von D(-)-Milchsäure	63
4.4. Allgemeine Schlußfolgerungen	65
5. ZUSAMMENFASSUNG	67
SUMMARY	68
6. LITERATURVERZEICHNIS	69

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

1.1. D(-)-2-Hydroxysäuren-Dehydrogenase - Vorkommen, Verbreitung und Charakterisierung

Seit den Arbeiten von Wislicenus (1873) weiß man, daß Milchsäure in zwei stereoisomeren Formen existiert, die aufgrund ihres entgegengesetzten Drehsinnes im polarisierten Licht als L(+)- und D(-)-Milchsäure bezeichnet werden (LOCKWOOD und YORDER, 1965). Physiologischerweise entsteht intermediär im Körper nur L(+)-Lactat über anaerobe Glykolyse nach vermehrter Muskelarbeit (CORI und CORI, 1929; MEYERHOF und LOHMANN, 1926), für dessen Abbau im Cytosol verschiedene Isoenzyme bereitstehen (HARPER, 1973), die eine schnelle Umwandlung zu Pyruvat katalysieren.

Dagegen finden sich bis heute keine Hinweise dafür, daß D(-)-Milchsäure beim Säuger intermediär über den vielfach postulierten Aminoacetonzyklus gebildet wird. Deswegen wird sie als das unphysiologische Isomer bezeichnet. Sehr hohe orale Threoninggaben führen zwar bei Ratte und Mensch zu einer erhöhten Ausscheidung von Aminoaceton im Harn (URATA und GRANICK, 1961; MARVER und TSCHUDY, 1966), erreichen aber maximal nur 0.2 % der verabreichten Threonindosis (v. STUDNITZ, 1967). Auch existieren im Blutplasma vieler Spezies Oxidasen zum Abbau von Aminoaceton (BUFFONI und BLASCHKO, 1963), wobei nach ELLIOT (1960) Methylglyoxal entsteht. Diese Verbindung lieferte in vitro unter der Wirkung der weitverbreiteten Glyoxalase (EC: 4.4.1.5) D(-)- und L(+)-Lactat (DAKIN und DUDLEY, 1913).

Da die Synthese von Aminoaceton, der Ausgangssubstanz hypothetischer endogener D(-)-Milchsäurebildung quantitativ zu vernachlässigen ist, die weiteren Schritte des Aminoacetonzyklus nur für sich isoliert, zudem bisher lediglich unter in vitro Bedingungen darstellbar waren, und der Nachweis einer D(-)-Lactatsynthese ohne spezifische und empfindliche Methoden geführt wurde, muß der Aminoacetonzyklus als bedeutungslos angesehen werden.

-2-

Auch fehlt nach wie vor beim Warmblüter der Existenznachweis eines NAD-abhängigen Enzymes, das analog zur L(+)-Lactatdehydrogenase Spezifität für D(-)-Milchsäure besitzt. Bislang konnte es erst bei einigen Avertebraten isoliert werden (LONG und KAPLAN, 1968). Als gesichert darf dagegen das Vorkommen eines zinkhaltigen Enzymes mitochondrialen Ursprunges gelten, das mit FAD als Coenzym in vitro den Abbau von D(-)-Milchsäure katalysiert, darüberhinaus auch für andere D(-)-2-Hydroxysäuren Substratspezifität besitzt (TUBBS, 1964). In Abhängigkeit vom pH-Wert kann es reversibel von der inaktiven in die aktive Form übertreten (CAMMACK, 1968).

In den Organen verschiedener Tierarten wurde die Konzentration dieser D(-)-2-Hydroxysäuren-Dehydrogenase bestimmt (CAMMACK, 1969). Offensichtlich hat sie weite Verbreitung im Tierreich. Kleinere Spezies (Ratte, Meerschweinchen, Frettchen, Taube) besitzen in zahlreichen Organen wie z. B. Leber, Niere, Herz, Gehirn und die Ratte zusätzlich noch in der Milz relativ hohe Enzymkonzentrationen, während bei größeren Tieren (Rind, Schwein) lediglich in der Leber und der Niere nur vergleichsweise geringe Mengen gefunden werden konnten. Zwischen Fleischfressern (Frettchen) und Pflanzenfressern (Rind, Meerschweinchen, Ratte) konnte hinsichtlich seiner Konzentration kein Unterschied festgestellt werden. Bemerkenswerterweise erwies sich die Nierenrinde des Kaninchens mit 400 Units/kg Organfrischmasse als die bei weitem enzymreichste Quelle und der Dehydrogenasegehalt liegt damit im Vergleich zu anderen untersuchten Geweben immerhin 4 - 10-fach höher.

Neben dieser D(-)-2-Hydroxysäuren-Dehydrogenase ist bisher kein weiteres Enzym bekannt, das D(-)-Milchsäure als Substrat hat. Für ihre physiologische Bedeutung konnte allerdings keine Erklärung gefunden werden. Daher führte man die D(-)-Lactatutilisation der Gewebe auf die Existenz dieses Enzymes zurück. Arbeiten über das intermediäre Schicksal von D(-)-Lactat zeigten nämlich, daß das sogenannte unphysiologische Isomer wohl metabolisiert wird, aber offensichtlich in anderer Weise als L(+)-Lactat.

Der Übertritt vom Magen-Darmtrakt ins Blut erfolgt für beide Isomere gleich schnell (CORI und CORI, 1929; WILLIAMS und MACKENZIE, 1965; CRISTIE und CRANWELL, 1976), wahrscheinlich auf dem Wege einfacher Diffusion; doch es gibt Hinweise für stereospezifische Transportmechanismen an den verschiedenen Membranen. Nach Radioisotopenversuchen an Ratten, die über die Lactataufnahme ins Gehirn Aufschluß geben sollten, passiert rund 3mal mehr L(+)- als D(-)-Lactat die Blut-Hirnschranke (GJEDDE, EKLÖF und ANDERSON, 1975; OLDENDORF, 1973). Möglicherweise erklärt sich die unterschiedliche Fähigkeit der Gewebe, D(-)-Milchsäure in CO_2 umzuwandeln aus verschieden stark ausgeprägten stereospezifischen Transportmechanismen der einzelnen Membranen. Bei einem Stoffwechselvergleich zwischen L(+)- und D(-)-Milchsäure an Herz-, Leber- und Gehirnschnitten von Ratten und Enten bildete beispielsweise der Herzmuskel aus beiden Isomeren gleiche Mengen CO_2 , während die Leber geringere und das Gehirn beider Spezies überhaupt keine CO_2 -Produktion aus D(-)-Lactat aufwies (BRIN, OLSEN und STARE, 1952). Beim Abbau des unphysiologischen Isomeres findet offenbar keine vollständige Oxidation bis zum CO_2 statt, weil sich - mit gewebeabhängigen Unterschieden - der endogene O_2 -Verbrauch stets besser nach L(+)- als nach D(-)-Milchsäurezusatz stimulieren ließ. Nach Versuchen an Nierenschnitten vom Kaninchen und an perfundierten Rattenlebern entsteht, ohne Reduktion von NAD, aus D(-)-Lactat Pyruvat (BRITTEN, 1968; SCHIMASSEK, 1965). Dieser Abbauschritt wird von beiden Autoren auf eine nicht nur für Milchsäure spezifische Oxidase zurückgeführt, die sich allerdings, im Gegensatz zur L(+)-Lactatdehydrogenase, hormoneller Beeinflussbarkeit entzieht (SCHIMASSEK, 1965).

Im Tierversuch konnte CO_2 -Bildung aus D(-)-Milchsäure gezeigt werden, allerdings finden sich Hinweise für eine dosisabhängige Limitierung. So setzten eviszerierte Kaninchen nur begrenzte Mengen um, im Vergleich zum L(+)-Isomer rund 10mal weniger. Nach Erhöhung der Milchsäurekonzentration im Blut ließ sich nur eine Steigerung der Oxidationsrate von L(+)-Lactat, nicht aber von D(-)-Lactat erzielen

(DRURY, WICK und MORITA, 1954; DRURY und WICK, 1965).

Bei der Ratte wurde ein relativ zum L(+)-Lactat 4mal langsamerer Umsatz von D(-)-Milchsäure festgestellt (CORI und CORI, 1929).

Es gibt darüberhinaus Hinweise dafür, daß sich die Umsetzung von D(-)-Lactat in besonderen Zellkompartimenten vollzieht. Nur so ist es zu erklären, warum die Umwandlung des aus D(-)-Milchsäure gebildeten Pyruvates träge verläuft (SCHIMASSEK, 1965) und das D(-)-Isomer daher trotz anschließender Synthese einer Substanz mit glucoplastischen Eigenschaften nur einen geringen Beitrag zur Gluconeogenese leistet. Es konnte zwar die Behauptung, daß überhaupt kein Glykogen entsteht (CORI und CORI, 1929) widerlegt werden, jedoch erwies sich auch ^{14}C -markierte D(-)-Milchsäure nach parentaler Applikation als 10mal schlechterer Vorläufer für die Synthese von Muskelglykogen gegenüber L(+)-Lactat (WARNROCK et al., 1965). Auch zur Glykogensynthese der Leber wird peroral verabreichte D(-)-Milchsäure schlechter verwertet. Nach Verabreichung von in 2er Position mit ^2H - und ^{14}C -markierter D(-)- und L(+)-Milchsäure fand sich zwar das ^{14}C aus beiden Isomeren im Leberglykogen wieder, aber das Deuterium konnte bemerkenswerterweise nur nach L(+)-, nicht dagegen nach D(-)-Lactatgabe im Leberglykogen nachgewiesen werden (HOBERMAN und D'ADAMO, 1960).

Diese Erkenntnisse, die alle an Ratten gewonnen wurden, also an einer monogastrischen Spezies, zeigen, daß grundsätzlich Stoffwechselwege zur Gluconeogenese bestehen.

Nach neueren Versuchen an Schafen und Ziegen können beim Wiederkäuer sehr große Anteile, nämlich über ein Drittel i. v. verabreichter radioaktiv markierter D(-)-Milchsäure in Glucose umgewandelt werden (STANGASSINGER, 1976).

Offenbar besitzt D(-)-Lactat bei Wiederkäuern wesentlich bessere gluconeogenetische Eigenschaften, weil dessen Gesamtstoffwechsellaage in weit höherem Maße als beim Monogastrier auf Gluconeogenese ausgerichtet ist.

1.2. D(-)-Milchsäure als Fermentationsprodukt bei Monogastriern

D(-)-Milchsäureproduktion dürfte ausschließlich auf Stoffwechselvorgänge mikrobieller Art zurückzuführen sein. Neben Bakterien wie Laktobazillen und Streptokokken sind auch Aktinomyeten und Rhizopusarten in der Lage, entweder L(+)- oder D(-)-Lactat bzw. DL-Racemat zu bilden (HOLTEN, 1971). Da bei Mensch und Tier der Verdauungskanal von einer, für die jeweilige Spezies spezifischen Mikroflora besiedelt ist, kommt als eine Möglichkeit exogener Zufuhr im Magen-Darmtrakt gebildete D(-)-Milchsäure in Frage, die nach Resorption aus dem Verdauungskanal im Intermediärstoffwechsel des Makroorganismus anfallen kann.

Wiederkäuer stellen Spezies dar, die sich trotz umfangreicher fermentativer Verdauung wenig mit D(-)-Lactat auseinandersetzen müssen. Im Pansen häuft sich physiologischerweise keine D(-)-Milchsäure an, weil lactilytische Bakterien für schnellen Abbau sorgen; sie ist daher normalerweise im Blut auch nicht nachweisbar (STANGASSINGER, 1976). Erst wenn durch extreme Fütterung die lactatabbauenden Bakterien zurückgedrängt werden, erscheint D(-)-Lactat pathologischerweise als Endprodukt der Fermentation und führt nach Übertritt ins Blut zum Krankheitsbild der D(-)-Lactatacidose (DUNLOP und HAMOND, 1965; MACKENZIE, 1967).

Fermentative Vorgänge im oberen, also noch vor dem resorptiven Teil des Verdauungstraktes, beschränken sich jedoch nicht nur auf Wiederkäuer. Auch im Magen mancher Monogastrier laufen fermentative Verdauungsprozesse ab. Milchsäure kann dabei, im Gegensatz zum Pansen, physiologischerweise als Endprodukt der Fermentation auftreten und bei den einzelnen Tierarten in diesem Abschnitt zu unterschiedlich hohen Konzentrationen führen (s.Tab. 1).

Anhand weiterer Beispiele soll verdeutlicht werden, daß bei Monogastriern nahrungsabhängig in ganz unterschiedlicher Weise Magenfermentationen ablaufen können und sich daraus in anatomischer und funktioneller Hinsicht tierartliche Besonderheiten entwickelt haben. Beträchtliche Unter-

schiede bestehen auch in der Art der Keimbesiedelung und der Bedeutung für den Energie- und Vitaminhaushalt.

Tabelle 1

Milchsäurekonzentrationen im oberen Verdauungstrakt einiger Monogastrier

Spezies/Organ	DL-Milchsäure (mmol/kg bzw. l)	
Huhn/Kropf	151,1 (22,2-311,1)	Bolton, 1965
Schwein/Magen	53,6 $\pm$ 25,6	Koch, Ledineck und Giesecke, 1972
Pferd/Magen	14,0 $\pm$ 1,9	Alexander und Davies, 1963
Kaninchen/Magen	4,0 $\pm$ 0,3	Alexander und Chowd- hury, 1958
Schaf/Vormagen	0,3 $\pm$ 0,3	Brüggemann und Gie- secke, 1968

So beziehen Languraffen, die zu den Primaten gerechnet werden, rund 77% ihres Grundumsatzes aus mikrobiellen Stoffwechselprodukten des Magens, in dessen Unterteilungen anaerobe Keime gute Lebensbedingungen finden. Hauptsächlich fressen diese Tiere Blätter, die eine cellulolytische Bakterienflora, vorwiegend Bacteroidesarten, zu niedermolekularen Säuren abbaut (BAUCHOP und MARTUCCI, 1968).

Im Magen zweier frischgetöteter, ostafrikanischer Colobusaffen ließ sich neben flüchtigen Verbindungen D(-)-Milchsäure in Konzentrationen von 2,22 mmol bzw. 0,45 mmol/l nachweisen. Inkubierter Mageninhalt bildete als Hauptfermentationsprodukt Milchsäure, für die Staphylokokkenstämme verantwort-

lich gemacht werden konnten. Dabei ließen sich Unterstämmen mit unterschiedlicher stereospezifischer Fähigkeit zur Lactatzyklase isolieren (OHWAKI, HUNGATE und LUTHER, 1974).

Der Magen der Ratte und anderer Muriden wird zu 2/3 von kutaner Schleimhaut ausgekleidet und bietet in diesem Teil neben anderen Mikroorganismen gerade Laktobazillen gute Lebensbedingungen. Kohlenhydrate der Nahrung werden zuerst von einer hochaktiven Speichelamylase aufgespalten, bevor umfangreiche Gärungsvorgänge beginnen können. Zunehmende Gärung des Mageninhaltes, hervorgerufen durch die Tätigkeit der Mikroorganismen, inaktiviert ab einem bestimmten pH-Wert die für den Gärungsverlauf so wichtige Amylase. Durch diesen Regelmechanismus zieht sich die Fermentation über Stunden hin, sodaß ein nur schrittweise verlaufender Abbau erfolgt. Dadurch können im Magen der Ratte über lange Zeit Kohlenhydrate gespeichert werden (PETERS, 1973; PETERS und GÄRTNER, 1973).

Beim Kaninchen laufen durch die Eigentümlichkeit der Caecotrophie, also den Verzehr einer bestimmten bakterienhaltigen Blinddarmkotfraktion, Fermentationsvorgänge im Magen ab (ELEN, 1940). Tagesrhythmisch wird aus dem Blinddarminhalt nach Passage des proximalen Colons Hart- oder Weichkot gebildet (HENNING und HIPD, 1972; BONNAFOUS und RAYNAUD, 1968; RUCKENBUCH und FIRAMONTI, 1976). In der Hartkotphase erfolgt durch Sekretion bakteriolytischer Stoffe Keimreduktion, Wasser wird resorbiert, aber mikrobiell gebildete Vitamine und Proteine gehen dem Körper verloren. Dagegen erhält der Blinddarminhalt in der Weichkotphase vom proximalen Colon eine Mukoidmembran, die ihn zu kleinen Pellets formt, die 6 Stunden lang im Magen intakt bleiben (WÖRNICKL, 1972).

Fermentative Prozesse laufen bereits im Caecum ab, dessen Produktion von kurzen Fettsäuren die 30% des Grundumsatzes liefert (CUSME und LANARI, 1966; JEN und WERNICKL, 1973), doch läßt sich D(-)-Milchsäure in diesem Teil des Verdauungstraktes nicht nachweisen (PARKER und MOULD, 1977).

Dagegen kann im Magen eine Milchsäuregärung vorliegen, wenn von Caecotrophie stattfinden (GRIFFITHS und DAVIES, 1963;

ALEXANDER und CHOWDHURY, 1958), weil Kohlenhydrate der Nahrung durch die Speichelamylase zusammen mit bakterieller Amylase der Fermentation zugänglich gemacht werden.

Caecotrophie beginnt deshalb erst mit Ausbildung der Enzyme für den Kohlenhydratabbau, etwa in der 3. Lebenswoche, gleichzeitig mit der Umstellung auf feste Nahrung (ALUS und EDWARDS, 1977). Erst dann beginnt der Blinddarm zu wachsen und Laktobazillen, die vorher noch nicht nachweisbar waren, treten reichlich auf (SMITH, 1965; FONTY, 1974; GONET, FONTY und RIOU, 1976; KAMETAKA, 1973). Diese Milchsäure hat beim Kaninchen zudem offenbar auch eine physiologische Bedeutung, da sie die Verzehrsregulation und Peristaltik des Magen-Darm-Kanals beeinflussen kann (LE BARS u. DEMAUX, 1966). Neuere Versuche an inkubierten Caecotrophepellets lassen vermuten, daß bei der Milchsäuregärung im Magen des Kaninchens hauptsächlich D(-)-Lactat gebildet wird. Aus Stärke und Glucose werden rund 13-28% Gesamtlactat erzeugt. In Abhängigkeit vom pH-Wert entsteht dabei über die Hälfte bzw. ausschließlich D(-)-Milchsäure (HÖRNICKE und MACHIEWICZ, 1976; MACHIEWICZ, 1974).

1.3. D(-)-Milchsäure als Bestandteil fermentierter Nahrungsmittel des Menschen

Eine weitere Möglichkeit einer D(-)-Milchsäurebelastung für den Intermediärstoffwechsel kann durch Verzehr mikrobiell fermentierter Nahrungsmittel gegeben sein, wie sie der Mensch seit Jahrtausenden zu sich nimmt. Daher verdient D(-)-Milchsäure besonders im Hinblick auf die menschliche Ernährung besonderes Interesse. Als Monogastrier ohne mikrobielle Aktivität im resorptiven Teil des Verdauungstraktes kann ihm von daher D(-)-Lactat sicher nicht zugeführt werden, doch durch Verlegung der Fermentation außerhalb des Körpers setzt auch er sich über die Nahrung mit diesem Isomer auseinander (s. Tab. 2).

Da der D(-)-Lactatgehalt mancher Nahrungsmittel relativ hoch ist, kann unter einseitigen Ernährungsgewohnheiten relativ viel aufgenommen werden. Als "acceptable daily intake" wird

von der WHO (WHO REPORT, 1967) ein Wert von 100 mg/kg Körpergewicht (entsprechend 1.11 mmol/kg) angegeben, der als ein Hinweis für den "Fremdstoffcharakter" der D(-)-Milchsäure aufgefaßt werden könnte, da eine entsprechende Angabe für L(+)-Lactat fehlt.

Tabelle 2

D(-)-Milchsäurekonzentration einiger Nahrungsmittel

D(-)-Milchsäure mmol/kg bzw. l		
Rohwurst (Cervelat)	: 99,0	Kandler, 1973
Salzgurken (Lake)	: 61,7	
Karotten (Saft)	: 44,4	
Rote Beete (Saft)	: 42,2	
Joghurt	: 5,2-101,3	Wiesner, et al. 1975

Unverträglichkeitsreaktionen auf D(-)-Milchsäure sind beschrieben worden. Menschliche Säuglinge zeigten auf perorale Gaben racemischer Milchsäure acidotische Erscheinungen bei verminderter Ca- und N-Retention. Größere Mengen mit dem Harn ausgeschiedener Milchsäure weisen auf ein Unvermögen zur Metabolisierung hin (DROESE und STOLLEY, 1964). Da diese Erscheinungen beim erwachsenen Menschen als pathologische Ausnahme gelten, darf man annehmen, daß erst im höheren Lebensalter D(-)-Lactat besser metabolisiert wird.

1.4. Problemstellung

Als einzige mögliche Quelle der D(-)-Milchsäure kommen mikrobielle Fermentationsvorgänge in Betracht, wie sie im oberen Verdauungstrakt mancher Monogastrier ablaufen. Soweit im Verdauungstrakt keine weitere Umsetzung erfolgt, kommt es zur Anhäufung von D(-)-Lactat mit anschließender Resorption. Abhängig von Art und Ausmaß der Milchsäuresynthese könnte bei manchen Tierarten physiologischerweise eine kontinuierliche metabolische Auseinandersetzung mit diesem Isomer notwendig werden.

Nach den heutigen Kenntnissen besteht kein Zweifel mehr darüber, daß D(-)-Milchsäure im Säugetierorganismus tatsächlich metabolisiert werden kann. Der Abbau verläuft jedoch langsamer als beim L(+)-Lactat, die Oxidation erfährt eine frühzeitige Limitierung und zur Gluconeogenese wird nur ein geringerer Beitrag geleistet, weil bei der Metabolisierung von D(-)-Lactat qualitativ und quantitativ ein andersartiger enzymatischer Mechanismus wirksam wird. Die Erkenntnisse von CAMMACK (1969) über die D(-)-2-Hydroxysäuren-Dehydrogenase passen gut zu den Befunden über den begrenzten Stoffwechsel von D(-)-Lactat. So erscheint die Annahme berechtigt, daß dieses Enzym auch in vivo den natürlichen und einzigen Biokatalysator zum Abbau von D(-)-Milchsäure darstellt. Da es das einzig bekannte Enzym ist, das D(-)-Milchsäure als Substrat hat, scheint es die biochemische Aufgabe zu haben, aus dem Verdauungsstoffwechsel anfallendes D(-)-Lactat zu eliminieren. Seine intramitochondriale Lokalisation und relativ schwache Aktivität könnten eine Erklärung dafür bieten, warum D(-)-Milchsäure nur langsam umgesetzt wird. Welche Rolle dabei in vivo Aktivierungsvorgänge spielen, ist unbekannt (CAMMACK, 1968).

Die eigentliche Funktion der D(-)-2-Hydroxysäuren-Dehydrogenase erscheint bis jetzt ungeklärt. Aus der Tatsache, daß dieses Enzym in mehreren Organen bei verschiedenen Spezies existiert, und aus der tierartlich unterschiedlichen Aktivität kann auf einen Zusammenhang mit der D(-)-Milchsäurebildung im Verdauungstrakt geschlossen werden. Allerdings

fehlen bis jetzt Beweise für tierartlich bedingte Differenzen in der gastro-intestinalen Produktion von D(-)-Lactat.

Intermediär wird D(-)-Lactat durch D(-)-2-Hydroxysäuren-Dehydrogenase zu Pyruvat oxidiert. Durch diesen Schritt ist ein wesentlicher Unterschied gegenüber dem L(+)-Isomer beseitigt. Da Pyruvat anschließend leicht zu CO_2 oxidiert werden kann, erschien die quantitative Messung der Oxidationsrate über die CO_2 -Exhalation als eine geeignete Methode zur Bestimmung der Metabolisierung. Dies machte die Verabreichung von ^{14}C -markierter D(-)-Milchsäure erforderlich. Durch kontinuierliche Messung der Aktivitätsausscheidung sollte so eine Aussage über die Elimination beim intakten Tier gewonnen werden. Um eine tierartlich vergleichende Betrachtung des D(-)-Lactatstoffwechsels zu ermöglichen, wurden Dosen und Meßergebnisse auf die metabolische Körpergröße bezogen.

Die Höhe der Ausscheidung von D(-)-Lactat bzw. seiner Folgeprodukte sollte als weiterer Maßstab für die Metabolisierung dienen, weil davon ausgegangen werden kann, daß, sobald die intermediäre Umsetzung limitiert ist, andere Mechanismen zur Beseitigung von D(-)-Milchsäure an Bedeutung gewinnen. Zur Erfassung möglicher Stoffwechselprodukte im Harn erschien die Verwendung der ^{14}C -Markierung aus D(-)-Lactat gleichermaßen geeignet.

Die Auswahl der Versuchstierarten fand unter den schon zuvor erwähnten Gesichtspunkten statt.

Das Kaninchen als monogastrische Tierart mit starker Magenfermentation und überwiegender D(-)-Lactatsynthese der Caecotrophe in vitro (MACHIEWICZ, 1974), sowie hoher Aktivität an D(-)-2-Hydroxysäuren-Dehydrogenase in der Nierenrinde (CAMMACK, 1969) bot sich als ideales Stoffwechselmodell an.

Als Vergleichsspezies erschien die Ratte am besten geeignet, da über ihren D(-)-Milchsäurestoffwechsel schon einiges bekannt ist. So haben frühere Versuche zu sehr auffälligen Unterschieden in der renalen Ausscheidung von D(-)-Milchsäure geführt, die möglicherweise auf beträchtliche Differenzen in der Dosis zurückzuführen sind (CORI und CORI, 1929;

MEDZIHRAZKY und LAMPRECHT, 1966; FABRITIUS, 1974). Darüberhinaus kennt man auch ihre Enzymaktivitäten. Zudem finden im Magen der Ratte ebenfalls Fermentationsprozesse statt, für die aber andere Bedingungen gelten als beim Kaninchen.

Der Mensch kann als weiteres ideales Stoffwechselmodell für eine derartige Untersuchung insofern angesehen werden, als er sich von den beiden vorgenannten Tierarten durch das Fehlen einer Magenfermentation unterscheidet. Belastungen mit D(-)-Milchsäure sind nur sporadisch über die Nahrung zu erwarten. Da die experimentellen Möglichkeiten hier begrenzt sind, erhoffte man sich durch vergleichende Betrachtung eines so wichtigen Eliminationsmechanismus wie die Ausscheidung von D(-)-Milchsäure über die Niere Rückschlüsse auf die Metabolisierung. Ein weiterer wichtiger Aspekt, insbesondere den Mensch in die Untersuchung über die metabolische Bewältigung von D(-)-Lactat einzubeziehen, ergab sich aus der WHO-empfohlenen Höchstmengenbegrenzung.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Durchführung der Tierversuche

Das experimentelle Vorgehen konnte bei den drei genannten Spezies nicht identisch sein. Bei Kaninchen kam es vor allem darauf an, einerseits die Beteiligung der Caecotrophe am D(-)-Milchsäurestoffwechsel im Magen und andererseits die intermediäre Metabolisierung bzw. renale Ausscheidung von D(-)-Milchsäure zu messen. Zu diesem Zweck erfolgte die Verabreichung von ^{14}C -markiertem D(-)-Lactat (Amersham Buchler, Braunschweig) teils in den Magen in Gegenwart und Abwesenheit von Caecotrophe und teils parenteral. Die Kapazität der Metabolisierung wurde anhand der Oxidationsraten bei unterschiedlicher Belastung ermittelt.

Bei den Untersuchungen an Ratten stand die Frage nach Metabolisierung von D(-)-Milchsäure bei hoher peroraler Belastung im Vordergrund, da über den Stoffwechsel bei parenteralen Gaben niedriger Dosen bereits Ergebnisse vorliegen. Die Untersuchungsmethode unter Verwendung von D(-)(U- ^{14}C)-Milchsäure wurde hier in gleicher Weise angewendet wie bei Kaninchen.

In den Untersuchungen am Menschen erschien es besonders interessant D(-)-Milchsäure peroral in einem Dosisbereich zu verabreichen, der unter bzw. über der WHO-Empfehlung lag.

Im Verlaufe der eigenen Tierversuche wurden Kaninchen und Ratten Lösungen von D(-)-Milchsäure auf verschiedene Weise verabreicht.

Bei Kaninchen erfolgte die perorale Applikation jeweils unter Lokalanästhesie (1%iges Pantocain[®], Hoechst, Wiesbaden) mit Hilfe einer 3 mm starken PVC-Nasenschlundsonde, die mit Glycerin gleitfähig gemacht worden war. Manuell fixierten Ratten wurde D(-)-Milchsäure peroral über eine stabile Magensonde durch den Mund eingegeben. Intraperitonealer Applikation ging beim Kaninchen eine Lokalanästhesie der Bauchdecke mit 2 ml Hostacain[®] (Hoechst, Wiesbaden) voraus. Dadurch konnte i. p. eine Braunüle gesetzt werden, über die

nach Kontrolle die Versuchslösung verabreicht wurde.

In allen Untersuchungen wurde ein synthetisches Milchsäure-Racemat verwendet, das ein Isomerenverhältnis von $D(-):L(+)$ $\approx 1(+)$ hatte. Für Versuchszwecke wurde dieses Präparat mit Natronlauge teilneutralisiert und mit Aqua tridest. bis zur gewünschten Konzentration verdünnt. Für perorale Verabreichung erfolgte eine Teilneutralisation, für i. p. Gaben eine Vollneutralisation mit Natronlauge. Für die radioaktive Markierung der $D(-)$ -Milchsäure-Lösung wurde $D-^{14}C-D(-)$ -Lactat verwendet. Obwohl alle Versuche auf dem oben erwähnten Milchsäure-Racemat beruhten, wird in den Ergebnissen bei Dosierungs- und Konzentrationsangaben aus Gründen der Vereinfachung mit wenigen Ausnahmen nur auf $D(-)$ -Milchsäure Bezug genommen.

2.2. Versuchstiere, Haltung und Fütterung

Der überwiegende Teil der Versuche wurde an ausgewachsenen Kaninchen beiderlei Geschlechts durchgeführt. Aus versuchstechnischen Gründen wurden sie in 2 Gruppen unterteilt. Für die Versuche unter 3.1.1. standen 5 Tiere mit einem Körpergewicht von 4-5 kg zur Verfügung, während die Versuche unter 3.1.2.-3.1.5. an 8 weiteren Kaninchen, die zwischen 0,8-1,5 kg wogen, durchgeführt wurden. In der versuchsfreien Zeit waren sie entsprechend der Größe einzeln oder paarweise unter natürlichen Lichtverhältnissen in Metallkäfigen mit Gitterrost untergebracht. Sie erhielten 2mal täglich jeweils 25g/kg Körpergewicht eines pelletierten Trockenfutters (Altromin 2023[®], Altrogge Kraftfutter GmbH, Lage/Lippe), sowie Heu und Wasser ad libitum.

Für die Untersuchungen an Ratten dienten männliche und weibliche Tiere der Sprague Dawley Linie, die zwischen 170 und 240g wogen. In Einzelkäfigen mit Einstreu wurde ihnen Altrominstandardfutter für Ratten und Wasser ad libitum angeboten.

Für den Humanversuch stellten sich 2 männliche und 3 weibliche gesunde Personen zur Verfügung. Sie waren im Alter

von 28-46 Jahre und wogen zwischen 61 und 74 kg. Die im übrigen selbstgewählte Ernährungsweise war lediglich für die Dauer des Versuches dahingehend eingeschränkt, daß die Aufnahme D(-)-lactathaltiger Nahrungsmittel unterblieb.

2.3. Probengewinnung

Blutproben wurden von Ratten und Kaninchen gewonnen. Die Blutproben von lebenden Kaninchen (3.1.1.) mit einem Volumen von 5-10 ml wurden mit Hilfe von Einwegkanülen und Einmalspritzen aus der Ohrvene entnommen. Von getöteten Tieren (3.1.4.) entstammte das Blut aus der Aorta und Vena portae. Die Gewinnung von Rattenblut erfolgte bei 5 Tieren mit 2 ml Einmalspritzen durch Herzpunktion. Da jedoch zur Bestimmung des endogenen D(-)-Milchsäurepools (3.2.1.) größere Volumina nötig waren, fand an 5 weiteren Tieren eine Durchtrennung der Aorta statt, worauf pro Tier 5-8 ml Blut entnommen werden konnten.

Derartig gewonnene Blutproben wurden mit kristallinem Na-Heparinat (Serva, Heidelberg) gerinnungsunfähig gemacht und sofort im gleichen Verhältnis mit 0,6 m HClO_4 zur Enteiweißung versetzt. Nach 15minütigem Zentrifugieren bei 15000g wurde der klare Überstand bei $+4^\circ\text{C}$ bis zur weiteren Analyse im Kühlschrank aufbewahrt.

Harnproben der Tierexperimente (3.1.3. und 3.2.3.) wurden als Spontanharn in Stoffwechselkäfigen gewonnen. Jeweils kam der 6- bzw. 24-Stundenharn zur Analyse. Zur Verhinderung eines mikrobiellen Abbaues erfolgte die Sammlung in einer Vorlage von 5 ml 0,6 m HClO_4 . Vom Gesamtvolumen wurde ein Aliquot mit 0,6 m HClO_4 im Verhältnis 1:2 enteieißt. Nach Zentrifugieren bei 15000g fanden die Analysen im klaren Überstand statt, der bis dahin ebenfalls im Kühlschrank gelagert wurde.

Die Aufbereitung der Harnproben aus dem Humanversuch (3.3.1.) erfolgte nach Bestimmung des Gesamtvolumens der einzelnen Miktionen in der gleichen Weise.

Mageninhaltsproben von Ratten und Kaninchen (3.1.1., 3.1.4. und 3.2.1.) wurden nach Tötung durch Genickschlag gewonnen.

Unmittelbar nach Pylorus- und Cardialligatur wurde der Inhalt durch einen kleinen Einschnitt in die Magenwand sofort in ein mit 0,6 m HClO_4 gefülltes Becherglas zur Fixierung überführt. Der Mageninhalt der Kaninchen mit einem Gewicht von 19-48 g wurde zunächst in 70 ml 0,6 m HClO_4 aufgenommen und Reste mit zusätzlicher 0,6 m Perchlorsäurelösung ausgespült. Aus der Gewichtsdiﬀerenz des vollen und leeren Magens erfolgte die Gewichtsbestimmung des Inhaltes. Die weiche Magenwand bei Ratten gestattet vollständige Gewinnung des Inhaltes, der 2,8-9 g betrug, durch manuellen Druck und wurde in 4 ml 0,6 m HClO_4 aufgenommen. Die Proben wurden darauf 20 Minuten bei 15000g zentrifugiert und D(-)-Lactat im klaren Überstand bestimmt. Bei den Versuchen unter 3.1.4. sollte die gesamte D(-)-Milchsäure erfaßt werden. Das machte weitere Aufarbeitungsschritte erforderlich. Daher wurde der Bodensatz 5mal mit Aqua tridest. resuspendiert und zentrifugiert. Eine vorausgegangene Ermittlung der Wiederfindensrate hatte sichergestellt, daß sich nach dieser Behandlung die Milchsäure quantitativ in der flüssigen Phase befand. Im Vakuumrotationsverdampfer wurde der nunmehr maximal 250 ml betragende Extrakt des Mageninhaltes auf 10 ml eingeengt und die Perchlorsäure im Eisbad mit festem K_2CO_3 gefällt. Die durch den Einengungsschritt bedingte starke Färbung der Probe machte vor der enzymatischen D(-)-Lactatbestimmung eine Entfärbung nach Barker und Summerson (BARKER, 1957) nötig.

2.4. Exhalationsradiometrie

Zur Messung der Oxidationsrate von ^{14}C -markiertem D(-)-Lactat wurde die Expirationsluft der Versuchstiere (3.1.2., 3.1.5. und 3.2.2.) kontinuierlich über ein Exhalameter geleitet (FHT 50 B; Friesecke und Hoepfner GmbH, Erlangen-Bruck). Dazu wurde pro Versuch ein Kaninchen in einen gläsernen Stoffwechselkäfig gesetzt (Volumen etwa 5 l), der so ausgestattet war, daß Kot und Harn getrennt erfaßt werden konnten. Zur Anhebung der CO_2 -Produktion in den Meßbereich des angeschlossenen Exhalameters wurden in den Ratten-

versuchen (3.2.2.) jeweils 3 Tiere pro Versuch in einen Stoffwechselkäfig gesetzt, der von FABRITIUS (1974) ausführlich beschrieben wurde. Die Meßdauer betrug 130 (3.1.5.), 360 (3.1.2.) bzw. 480 Minuten (3.2.2.).

In der Expirationsluft wurden simultan der CO_2 -Gehalt durch Infrarotspektrometrie und die $^{14}\text{-C}$ -Aktivität über einen Methandurchflußzähler mit einem Nutzeffekt von 13.5 % gemessen. Ein Dreipunktschreiber übertrug beide Werte und deren Quotient als Kurven sowie die Integrale dieser Größen. Die Berechnung der pro Zeiteinheit exhaliierten $^{14}\text{-C}$ -Aktivität (kBq/min) erfolgte nach den Beschreibungen von STANGASSINGER (1976).

Bei der Auswertung wurden die spezifische Aktivität ($\text{SA} = \text{kBq/mmol D(-)-Milchsäure}$) der Versuchslösung und das metabolische Körpergewicht der Tiere berücksichtigt.

2.5. Analytische Methoden

2.5.1. Enzymatische Bestimmung von Milchsäureisomeren

Alle enzymatischen Milchsäurebestimmungen wurden in 0.3 m HClO_4 vorgenommen, die auf folgendem Prinzip beruhten:



Meßgröße war die Konzentration des gebildeten $\text{NADH} + \text{H}^+$, das am Eppendorf-Photometer bei 366 nm eine Extinktionsänderung hervorrief. Das Probenvolumen betrug 0.1 ml. Nach HOHORST, GAWEHN und BERGMAYER (1970) erfolgte für beide Isomere die Bestimmung gemäß den Angaben der Fa. Boehringer mit den jeweils stereospezifischen Enzymen (L(+)-LDH aus Schweinemuskel, E.C. 1.1.1.27, D(-)-LDH aus *Lactobacillus leichmannii*, E.C. 1.1.1.28; Boehringer, Mannheim).

Über die Extinktion eines Li-Standards in dem zu erwartenden Konzentrationsbereich erfolgte die Berechnung der Probenkonzentrationen.

2.5.2. ^{14}C -Aktivitätsbestimmung im Probenmaterial

Die ^{14}C -Aktivitätsbestimmung in Harn- und Blutproben sowie in den Versuchslösungen wurde im Flüssigkeitsszintillationszähler durchgeführt (Model 3375, Packard). Dazu wurden Proben-
volumina von 0.2 - 0.4 ml mit 10 ml Bray-Scintillator (BRAY, 1960) versetzt und 2 - 5 Minuten lang gezählt. Durch Zugabe eines ^{14}C -Standards bekannter Aktivität und erneute Impuls-
zählung konnte die jeweilige Zählausbeute ermittelt werden. Der stark gefärbte flüssige Mageninhalt konnte aufgrund seines hohen Impuls-Löscheffektes nicht sofort gezählt werden und wurde deshalb vorher im Sample Oxidizer (Model 306, Packard) aufbereitet. Durch eine vollständige, nicht-kataly-
tische Verbrennung wurde die ^{14}C -Aktivität als $^{14}\text{CO}_2$ von einer Adsorberlösung (9 ml Carbosorb[®], Packard) aufgefangen und konnte nach Zusatz von Szintillationsflüssigkeit (12 ml Permafluor[®], Packard) gemessen werden. In regelmäßigen Ab-
ständen wurde ein ^{14}C -Standard bekannter Aktivität unter gleichen Bedingungen verbrannt, um auftretenden ^{14}C -Aktivi-
tätsverlust während des Verbrennungs- und Zählvorganges fest-
stellen zu können.

2.6. Statistische Methoden

Die Ergebnisse der Messungen und Berechnungen wurden als Einzelwerte, bei Parallelversuchen als Mittelwerte ($\bar{x}$) und wo möglich deren Streuungen ($\pm s$) angegeben.

Lineare und nicht-lineare Regressionen bzw. deren Korrelationskoeffizienten erfolgten nach den Methoden von SACHS (1972). Mit Hilfe einer Signifikanz-Tabelle für r (Documenta Geigy, 1968) wurden die Korrelationskoeffizienten auf ihre Signifi-
kanz gegen Null für die dazugehörigen Freiheitsgrade geprüft.

3. ERGEBNISSE

3.1. Versuche zum D(-)-Milchsäurestoffwechsel an Kaninchen

3.1.1. Normalkonzentrationen von Milchsäureisomeren im Blut und Magen

Da zu Beginn dieser Arbeit die Auffassung bestanden hatte, daß bei Kaninchen eine enterale D(-)-Milchsäureproduktion im Magen vorhanden sein müsse, erschien es vor weiteren Stoffwechselversuchen zunächst einmal wichtig, aus den Normalkonzentrationen der Milchsäureisomeren und speziell des D(-)-Lactatgehaltes in Blut und Mageninhalt, Aufschluß über die Höhe dieses endogenen D(-)-Lactat-Pools zu bekommen.

Es wurde daher 5 Kaninchen zu verschiedenen Tageszeiten Ohrvenenblut entnommen (10.00, 12.30, 14.30, 18.30) und einer enzymatischen Analyse unterzogen. Für L(+)-Lactat ergaben sich dabei Konzentrationen von 1.07 - 1.56 mmol/l Vollblut. Dagegen lagen die Analysenwerte für D(-)-Milchsäure innerhalb der dreifachen Standardabweichungen der Blutwerte und somit unterhalb der Nachweisgrenze für eine enzymatische D(-)-Lactatbestimmung. Zur Überprüfung der Beurteilung, daß es sich dabei tatsächlich um unspezifische Extinktionen handelte, wurden zwei weitere Blutproben von verschiedenen Tieren enteilt, auf 1/5 ihres ursprünglichen Volumens eingeeengt und anschließend erneut einer enzymatischen D(-)-Lactatbestimmung unterzogen. Trotz des Konzentrierungsschrittes ergaben sich dabei dieselben Werte wie bei nicht-konzentrierten Proben. Aus diesem Grunde waren sie als unspezifisch für D(-)-Milchsäure zu betrachten und es war zu schlußfolgern, daß D(-)-Lactat im peripheren Blut des Kaninchens nicht nachweisbar war.

Da als weiterer endogener D(-)-Milchsäure-Pool der Mageninhalt in Betracht kam, wurden 3 Kaninchen getötet und nach Gewinnung und Aufbereitung des Inhaltes wie unter 2.4. beschrieben, wurde im Überstand eine enzymatische D(-)-Lactatbestimmung durchgeführt. Bei allen Tieren ergaben sich sowohl für die Probenleerwerte als auch für die Proben identische Extink-

tionen, worauf eine Konzentrierung wie oben beschrieben entfiel und auch der Mageninhalt entgegen den Erwartungen als frei von D(-)-Milchsäure beurteilt wurde*). Die Versuche unter 3.1.4., in denen $^{14}\text{-C}$ -markierte D(-)-Milchsäure intragastral während der Caecotrophiephase verabreicht wurde, bestätigten diesen Befund. Es ergab sich auch hier über eine Änderung der SA in keinem Fall ein Hinweis für einen nachweisbaren D(-)-Lactatspiegel im Magen.

3.1.2. D(-)-Milchsäure im Intermediärstoffwechsel des Kaninchens

Um Aufschluß über die intermediäre Behandlung bzw. Belastbarkeit der Metabolisierungs- und Eliminationsmechanismen von D(-)-Milchsäure bei Kaninchen zu bekommen, wurde (U- $^{14}\text{-C}$)markiertes D(-)-Lactat in steigender Dosierung verabreicht, 360 Minuten lang die $^{14}\text{-CO}_2$ -Ausscheidung gemessen und jeweils der nach 6 bzw. 24 Stunden abgesetzte Harn gesammelt. Durch intraperitoneale Applikation war eine quantitative Resorption gesichert und mikrobieller Einfluß ausgeschlossen. Für die Dauer der Versuchszeit verblieben die Tiere im Stoffwechselkäfig. Tabelle 3 gibt die Meßwerte der D(-)-Lactatoxidation 360 Minuten nach der Verabreichung wieder. Es sticht hervor, daß abgesehen von Versuch 1 stets weniger als die Hälfte der Dosis als CO_2 in der Expirationsluft erschien, also keine vollständige Oxidation von D(-)-Milchsäure erfolgt sein konnte. Um zu prüfen, ob diese Werte möglicherweise auf eine zu kurze

*) An einzelnen Kaninchen mit Magen fisteln wurden im Mageninhalt D(-)-Milchsäurekonzentrationen bis zu 0.25 mmol/l gefunden. Da diese Werte erheblich über den post mortem gewonnenen lagen, bestand der Verdacht einer unphysiologischen Hemmung des D(-)-Lactatabbaues. Darum wurden die Arbeiten an den präparierten Tieren nicht fortgesetzt.

Herrn Professor Dr. H. Hörnicke und Herrn Professor Dr. H. J. Ehrlein, Abteilung für Zoophysiologie der Universität Hohenheim, sei an dieser Stelle für die Operation der Tiere herzlich gedankt.

Tabelle 3

Oxidation von D(-)-Milchsäure beim Kaninchen innerhalb 360 Minuten nach i. p. Gabe von mit (U-¹⁴-C) D(-)-Lactat markiertem Di-Lactat

Versuch	Dosis D(-)-Milchsäure		Oxidierte D(-)-Milchsäure exhaliert		14-CO ₂ in % der Gesamt- CO ₂ -Ausscheidung
	mmol/kg	0.75 mmol C/kg	SA*	mmol C/kg	0.75 mmol/kg
1	0.42	1.26	66.85	0.741	0.25
2	0.62	1.86	56.89	0.911	0.30
3	1.12	3.36	22.31	1.479	0.49
4	1.19	3.57	28.74	1.479	0.51
5	1.83	5.49	61.76	2.029	0.68
6	1.92	5.76	18.49	2.019	0.67
7	2.21	6.63	13.08	2.596	0.87
8	2.36	7.05	12.94	3.277	1.09

* SA = kBq/mmol Lactat-C

$^{14}\text{-CO}_2$ -Messung zurückzuführen waren, wurde in Versuch 8 die Meßdauer auf 12 Stunden verlängert. Es zeigte sich aber, daß für den Zeitraum von 6 - 12 Stunden nach der Verabreichung mit 2 % der $^{14}\text{-C}$ -Dosis eine nur unwesentlich vermehrte Aktivitätsausscheidung über die Exhalation eintrat. Die 6-Stundenwerte entsprachen also im wesentlichen dem, was tatsächlich an $^{14}\text{-C}$ -Aktivität aus D(-)-Milchsäure retiniert und in Form anderer, nicht näher bestimmter Metaboliten, sei es Glucose, Glykogen oder biochemisch prinzipiell möglicher Lipidverbindungen, gespeichert worden sein mußte. Diese Art der intermediären D(-)-Milchsäurebehandlung veranlaßte dazu, die Oxidationsraten als metabolisierten Lactat-C anzugeben. Über die $^{14}\text{-CO}_2$ Menge der Expirationsluft konnte zwar der maximale Anteil vollständig oxidiierter D(-)-Milchsäure ermittelt werden, ließ aber die Frage offen, wieviel Mol CO_2 aus einem Mol D(-)-Milchsäure tatsächlich gebildet worden waren.

Der Oxidation von D(-)-Lactat kam verständlicherweise nur eine untergeordnete Bedeutung an der gesamten Oxidation von C-Verbindungen zu. Der Anteil der CO_2 -Ausscheidung aus D(-)-Lactat an der Gesamt- CO_2 -Exhalation stieg zwar mit Erhöhung der Dosis an, jedoch trug D(-)-Milchsäure abgesehen von Versuch 8 stets weniger als 1 % zu den gesamten oxidativen Vorgängen bei.

Tabelle 3 zeigt ferner, daß mit steigender Dosierung innerhalb von 360 Minuten eine vermehrte Oxidation von Lactat-C zu beobachten war, deren lineare Beziehung Abbildung 1 wiedergibt. Allerdings trat diese Erhöhung der Oxidationsrate nicht proportional zur Dosissteigerung ein. So stand einer Steigerung der Dosis um das 5.6-fache eine nur rund 3.5-fache Zunahme an oxidiertem Lactat-C gegenüber.

Tabelle 4 gibt eine Übersicht über den gesamten Oxidationsverlauf, der abschnittsweise über die mittlere $^{14}\text{-CO}_2$ -Ausscheidung aus je 2 Versuchen eines Dosisbereiches berechnet wurde. Die Unterteilung der 360 Minuten betragenden Meßdauer in 10 Intervalle erfolgte nach dem Gesichtspunkt der Linearität der $^{14}\text{-CO}_2$ -Exhalation. Ermittelt wurde jeweils der mittlere Minutenfluß an metabolisiertem Lactat-C. Zeit- und dosisabhängig ergaben sich dabei für die einzelnen Zeiträume

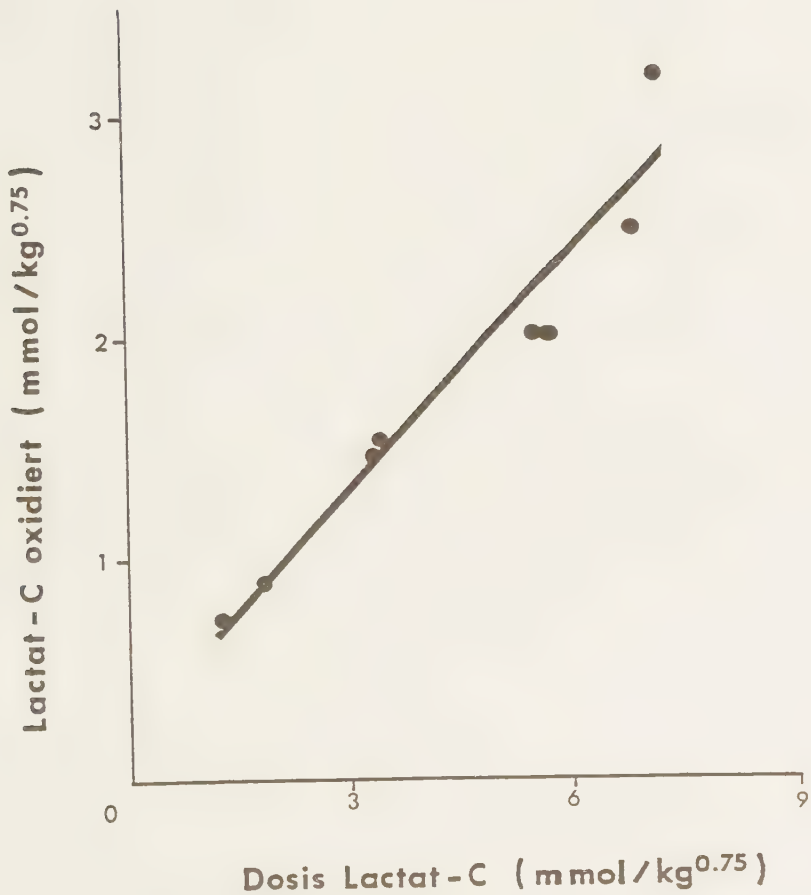


Abb. 1 Oxidierter D(-)-Lactat-C nach 360 min bei Kaninchen nach i.p. Gabe von (U-14-C)D(-)-Milchsäure
 $y = 0.1764 + 0.3747x$; $r = 0.96$; $n = 8$; $p < 0.001$

Tabelle 4

Oxidationsverlauf von D(-)-Milechäure bei Kaninchen über 240 Minuten nach i. p. Gabe von C(-)-H(+)-D(-)-Lactat.

Versuchs- nummer	Zeit nach Verabreichung (min)									
	0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80	80-90	90-100
(μmol C/min·kg ^{0.75} als Mittelwert aus je 2 Versuchen)										
1 u. 2	0.22	1.29	3.74	5.83	5.27	2.90	2.04	1.13	0.82	0.49
3 u. 4	0.44	1.37	4.97	9.70	8.02	7.55	5.07	2.31	1.49	0.86
5 u. 6	0.38	2.08	4.23	9.34	10.11	10.54	7.81	5.27	2.55	1.21
7 u. 8	1.64	2.18	4.03	12.55	15.12	14.23	8.95	7.64	4.19	0.94

Änderungen der Oxidationsraten als Anstieg bzw. Abfall des Lactat-C-Minutenflusses/kg^{0.75}. Diese berechneten Werte wurden zur Veranschaulichung des Verlaufes jeweils am Ende jedes Zeitabschnittes als Symbole in Abbildung 2 eingetragen. Da somit keine Ausscheidungskurven, sondern Oxidationsraten für Zeiträume festgehalten sind, wurden diese Symbole durch Striche verbunden.

Die Oxidation von D(-)-Milchsäure stellte sich bei Kaninchen als ein einphasiger Vorgang dar. Nach einem steilen Anstieg des Minutenflusses von Lactat-C erfolgte ein weniger steiler Abfall. Das Maximum der Oxidation lag in den beiden untersten Dosierungen (Versuche 1 u. 2 bzw. 3 u. 4) 50 - 90 Minuten nach Applikation. Nach höherer Dosierung trat es zeitlich verzögert auf, in Versuch 5 und 6 130 - 160 Minuten und in Versuch 7 und 8 90 - 130 Minuten nach der Verabreichung.

In allen Dosisbereichen war etwa 300 Minuten nach der D(-)-Milchsäuregabe ein starker Abfall der Oxidation auf die Ausgangswerte von 0 - 10 Minuten nach der Verabreichung zu beobachten. Diese Werte bestätigten den Befund der 12-stündigen 14-CO₂-Messung von Versuch 8. Es mußte daher angenommen werden, daß die intermediäre Oxidation von D(-)-Milchsäure bei Kaninchen nach rund 300 Minuten weitgehend abgeschlossen war.

3.1.3. Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im Harn bei Kaninchen

Die Ausscheidung der 14-C-Aktivität von verabreichter 14-C-D(-)-Milchsäure kann im wesentlichen auf zweierlei Weise erfolgen: als unveränderte D(-)-Milchsäure oder in Form von Transformationsprodukten derselben. Als solche kommen unter anderem 14-C-Harnstoff (aus 14-CO₂) oder 14-C-L(+)-Lactat (aus 14-C-Pyruvat) in Frage. In den hier beschriebenen Versuchen wurde wegen des geringen Anteils keine weitere Analyse über Bestandteile dieser unspezifischen Aktivität vorgenommen.

Wie nicht anders zu erwarten, trat mit zunehmender D(-)-Milchsäuredosis nach i. p. Verabreichung ein Anstieg der D(-)-Milchsäureausscheidung im Harn auf. Wie Tabelle 5 zeigt, bestand dabei keine Proportionalität, denn eine Dosiserhöhung

Abb. 2 Oxidationsverlauf von D(-)-Lactat nach
i. p. Gabe von (U-14-C)D(-)-Milchsäure
bei Kaninchen

● - 0.53; ○ - 1.86 } (mmol/kg^{0.75})
★ - 1.16; ■ - 2.29

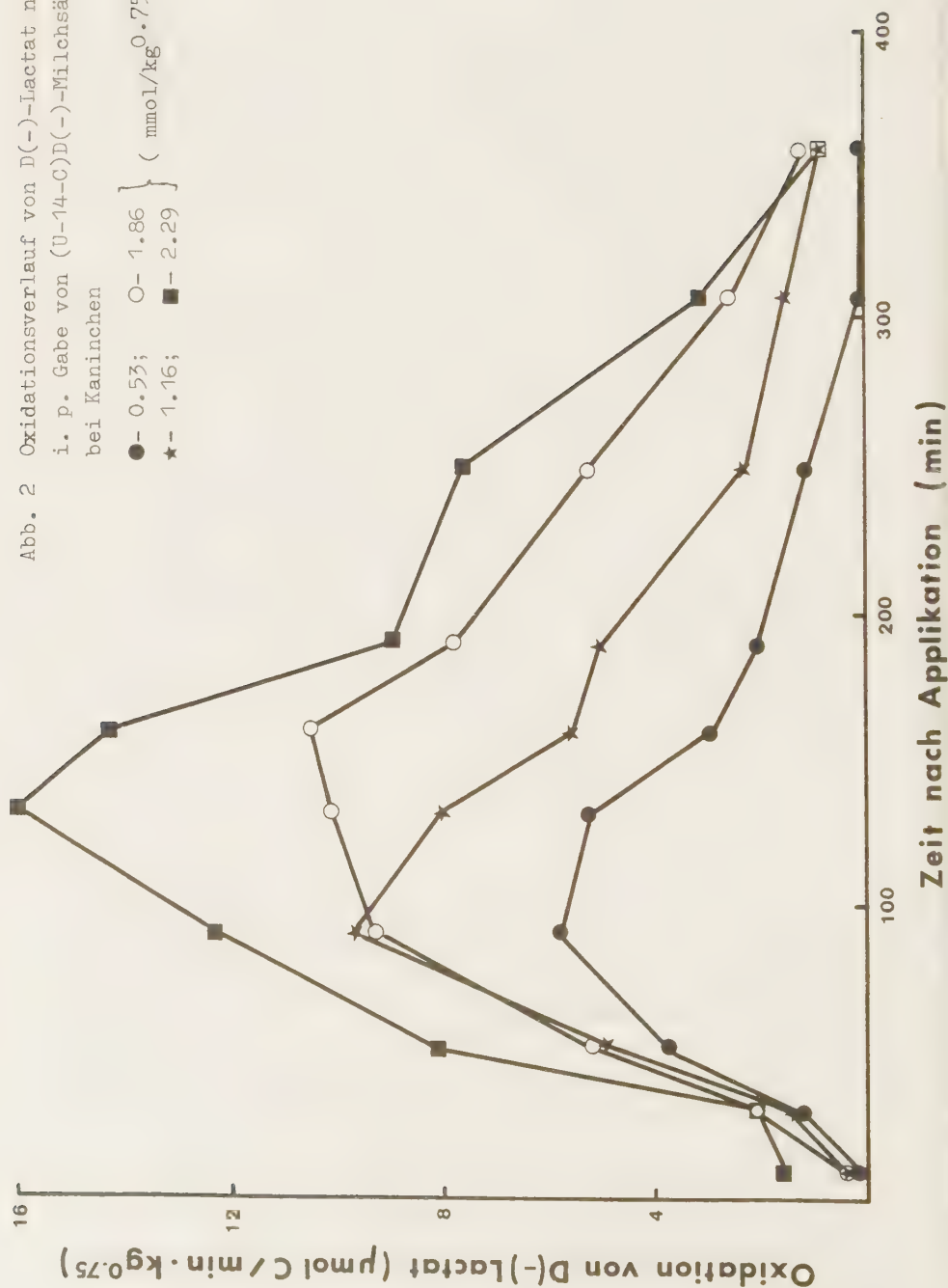


Tabelle 5

Ausscheidung von D(-)-Milchsäure (D(-)-MS) im 24-Stundenharn bei Kaninchen nach i. p. Gabe von (U-14-C)D(-)-Lactat

Vers.	Dosis mmol C/kg ^{0.75}	L-C der Dosis im Harn (mmol/kg ^{0.75})		L-C im Harn (% der Dosis)		Retention L-C %	
		Gesamt	als D(-)-MS	Gesamt	als D(-)-MS	mmol/kg ^{0.75}	der Dosis
1	1.26	0.042	0.022	3.36	1.66	0.48	37.9
2	1.86	0.039	0.021	2.08	2.08	0.91	48.9
3	3.36	—*	—	—	—	1.88	55.9
4	3.57	0.179	0.145	5.00	4.06	1.85	51.8
5	5.49	0.118	0.114	2.15	2.08	3.34	60.9
6	5.76	0.274	0.203	4.76	3.51	3.47	60.2
7	6.63	0.643	0.214	9.69	3.21	3.39	51.1
8	7.08	0.966	0.277	13.69	3.93	2.81	40.0

* kein Harnabsatz

a) 0.06, b) 0.06, c) 0.10 bzw. d) 0.09 umol/kg^{0.75} als D(-)-Milchsäure in der 6 - 24-Stunden Harnfraktion

auf 5.6-fache Werte bewirkte eine Zunahme der D(-)-Milchsäureexkretion auf das 11-fache. Außerdem waren noch 2 Beobachtungen auffallend:

- In den beiden niedrigsten Dosierungen ließ sich die über die Nieren ausgeschiedene D(-)-Milchsäure nur in der 0 - 6-Stundenharnfraktion nachweisen. 6 Stunden nach der Verabreichung mußte der Blutspiegel von D(-)-Lactat also soweit abgesunken sein, daß er unterhalb der Nierenschwelle lag.

- In 3 Versuchen mit höherer Dosierung (5, 7 und 8) ließ sich D(-)-Milchsäure noch in der 6 - 24-Stundenharnfraktion nachweisen. Möglicherweise bestand in diesem Zeitraum noch ein so hoher Blutspiegel an unveränderter D(-)-Milchsäure, daß ein Teil davon über die Nieren ausgeschieden wurde.

Da jedoch nicht ausgeschlossen werden konnte, daß dieser 6 - 24-Stundenharn schon früher, also noch während der ersten 6 Stunden nach Verabreichung gebildet, aber erst später abgesetzt worden war, mußte diese Beurteilung mit einer gewissen Einschränkung betrachtet werden.

Insgesamt gesehen lag die Ausscheidung unveränderter D(-)-Milchsäure über den Harn in einem Bereich von 1.66 - 4.06 % der Dosis. Von diesen Extremwerten abgesehen ergab sich eine durchschnittliche Ausscheidung von 2.9 %.

Aus der exkretierten ¹⁴C-Aktivität wurde über die spezifische Aktivität die Gesamtlactat-C-Ausscheidung berechnet. In den Versuchen 1 und 2 lag rund die Hälfte des im Harn erscheinenden Lactat-C in Form von Stoffwechselprodukten vor, die nicht näher identifiziert wurden. In der mittleren Dosierung (Versuch 4 und 5) dagegen wurde Lactat-C fast nur als D(-)-Milchsäure ausgeschieden. In den beiden höchsten Dosierungen machten die Stoffwechselprodukte jedoch mit 67 bzw. 71 % einen erheblichen Anteil der Gesamtlactat-C-Ausscheidung aus. Der Gesamtlactat-C im Harn erreichte dabei maximal 13.7 % (Versuch 8) der Dosis. Aufgrund dieser hohen Ausscheidung an D(-)-Milchsäuremetaboliten trat trotz Erhöhung der Dosis in Versuch 7 und 8 keine weitere Steigerung der Gesamtretention, sondern eher ein leichter Abfall ein.

3.1.4. D(-)-Milchsäurestoffwechsel im Magen unter Einfluß von Caecotrophe

Entgegen den Erwartungen ließ sich D(-)-Milchsäure, wie unter 3.1.1. bereits erwähnt, im Magen von 3 unbehandelten Kaninchen nicht nachweisen. In den folgenden Versuchen sollte an 8 Kaninchen durch intragastrale Verabreichung von (U- ^{14}C)-markiertem D(-)-Lactat während der Caecotropiephase dieser Befund überprüft bzw. das Schicksal von D(-)-Milchsäure unter dem mikrobiellen Einfluß von Caecotrophe bei Kaninchen untersucht werden. Dazu war es einerseits nötig, ^{14}C -Aktivität in ausreichender Menge zu verabreichen, sodaß auch geringfügige Änderungen der spezifischen Aktivität (SA) leicht nachgewiesen werden konnten. Da mikrobielle D(-)-Lactatproduktion nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnte, hätten andererseits zu hohe D(-)-Milchsäuregaben möglicherweise zu einer Hemmung bakterieller Synthesevorgänge geführt. Es erschien daher geeignet, durch die Versuchslösung eine Konzentration von nur 5,5 mmol/l im Mageninhalt zu erzeugen, also in einem Bereich zu arbeiten, der auch durch die enzymatische Analyse gut erfaßt werden konnte. Die Größe des Magen Volumens wurde mit 2,25% vom Körpergewicht angenommen, eine Schätzung, die sich in den meisten Fällen als richtig erwies.

Zur Gewinnung von Mageninhalt erfolgte in verschiedenen Zeitabständen nach der Applikation die Tötung der Tiere durch Genickschlag. Dadurch sollte es ermöglicht werden, über die D(-)-Milchsäurekonzentrationen im Magen unter Berücksichtigung der SA eine Aussage hinsichtlich Synthese- bzw. Abbauraten machen zu können.

Zusätzlich zum Mageninhalt wurden auch Blutproben aus der V. portae und Aorta einer Lactat- und Aktivitätsbestimmung unterzogen.

In Tabelle 6 wurden die zum Tötungszeitpunkt im Mageninhalt gefundenen Gesamt-C-Gehalte der Dosis denen, die als unveränderte D(-)-Milchsäure vorlagen gegenübergestellt. Da sich bei allen Tieren höhere Werte für den Gesamtlactat-C als für Lactat-C in Form von D(-)-Milchsäure ergaben, mußte dar-

Tabelle 6

L(-)-Milchsäure und ¹⁴C-Aktivität im Mageninhalt von Kaninchen nach peroraler Gabe von (U-¹⁴C)D(-)-Lactat

Vers.	Zeit n. Gabe (Min.)	Dosis ¹⁴ C- μmol	D(-)-MS SA*	L-C im Magen (μmol)		% d. Dosis als D(-)-MS	Stoffw.-Prod. v. D(-)-MS μmol C	% v. Ges. L-C
				Gesamt	als D(-)-MS			
1	7	222	156,8	281	275	41,6	6	2,1
2	15	234	172,8	200	106	15,4	94	47,3
3	15	185	198,8	318	57	9,9	261	82,2
4	20	231	150,8	145	128	18,5	17	11,9
5	30	347	279,3	282	136	12,9	146	51,7
6	45	205	153,3	161	81	12,8	80	49,8
7	45	272	352,9	213	103	12,7	110	51,6
8	55	300	120,1	232	60	6,7	172	74,0

* SA=kBq/l mmol L-C

aus gefolgert werden, daß keine Synthese, sondern ein mikrobieller Abbau von D(-)-Lactat und Überführung in andere 14-C-Verbindungen, vermutlich in kurze Fettsäuren, stattgefunden hatte, deren Aktivität gut meßbar war. Sah man von 2 Tieren (1 und 4) ab, bei denen die Nicht-D(-)-Milchsäureverbindungen von Gesamtlactat-C nur 2,1 bzw. 11,9% ausmachten, wurde bei den übrigen 6 Kaninchen ein großer Teil, nämlich 47 - 82% des Lactat-C der Dosis in Fremdaktivität überführt.

Da sich bei keinem Tier weder in der V. portae noch in der Aorta D(-)-Milchsäure nachweisen ließ, wohl aber 14-C-Aktivität, wurde daraus geschlossen, daß bei dieser niedrigen Dosierung nur durch mikrobiellen Abbau entstandene C-haltige Folgeprodukte resorbiert worden waren. Da bereits sieben Minuten nach der Verabreichung nur noch weniger als die Hälfte und 15 Minuten nach Applikation 15 bzw. 9,9% der D(-)-Lactatdosis im Mageninhalt nachzuweisen war, mußte ein sehr rascher mikrobieller Abbau durch die Caecotrophe erfolgt sein.

Aus dem weiteren Abfall von D(-)-Milchsäure in Prozent der Dosis ließ sich nach der Gleichung $\log y = 1,417 - 0,0091 x$ ein konzentrationsabhängiger Abbau berechnen, der in Abb. 3 dargestellt ist. Diese Abnahme des D(-)-Lactatumsatzes im Magen mit Abfall der Konzentration wird um so deutlicher, wenn man aus dem Gesamtlactatfluß vom Zeitpunkt der Applikation bis zur Probenentnahme den umgesetzten Lactat-C pro Minute berechnet (Tab. 7 und Abb. 5). Er sank von 55 μmol (Versuch 1) um rund ein Viertel auf 15 μmol (Versuch 8) und der folgte der Gleichung: $y = 1,759 - 0,0012 \log x$ ($p < 0,001$).

Die im Blut vorhandene Konzentration C-haltiger Verbindungen aus D(-)-Lactat in Form von Stoffwechselprodukten derselben wurde über die SA der Dosis berechnet. Danach fand sich in der Zeit des höchsten Lactat-C-Umsatzes, also des stärksten mikrobiellen Abbaues im Magen, auch in der Pfortader höchste Konzentration von D(-)-Milchsäuremetaboliten (Abb. 4). Proportional mit Abnahme des D(-)-Lactatumsatzes verminderte sich in der V. portae die 14-C-Aktivität und damit die Konzentration an Folgeprodukten.

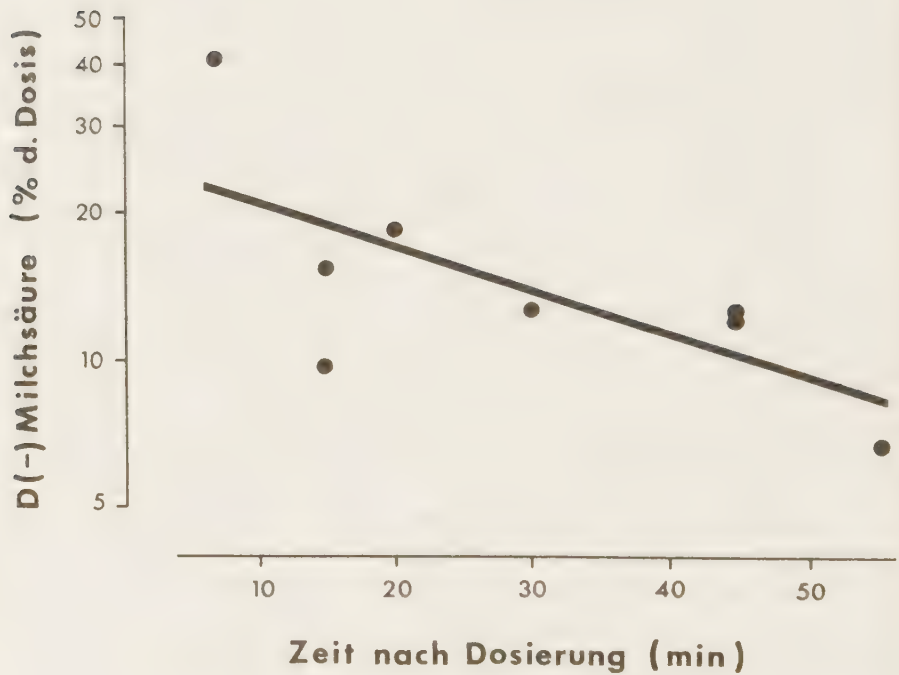


Abb. 3 Abnahme der Konzentration von D(-)-Milchsäure im Magen von Kaninchen bis zu 60 min nach Applikation

$$\log y = 1.417 - 0.0091x; r = 0.6964; n = 8; p < 0.05$$

Tabelle 7

Abbau von D(-)-Milchsäure im Magen bei Kaninchen

Versuch	Zeit nach Verabrei- chung (min)	Dosis D(-)-MS (μmol C)	Magen- inhalt (g)	abgebaute D(-)-Milchsäure (μmol C)	(μmol C/min)
1	7	222	48.8	385	55
2	15	234	35.7	585	39
3	15	185	23.1	512	34
4	20	231	48.3	562	28
5	30	347	47.5	914	30
6	45	205	23.2	549	13
7	45	272	18.8	707	16
8	55	300	19.8	839	15

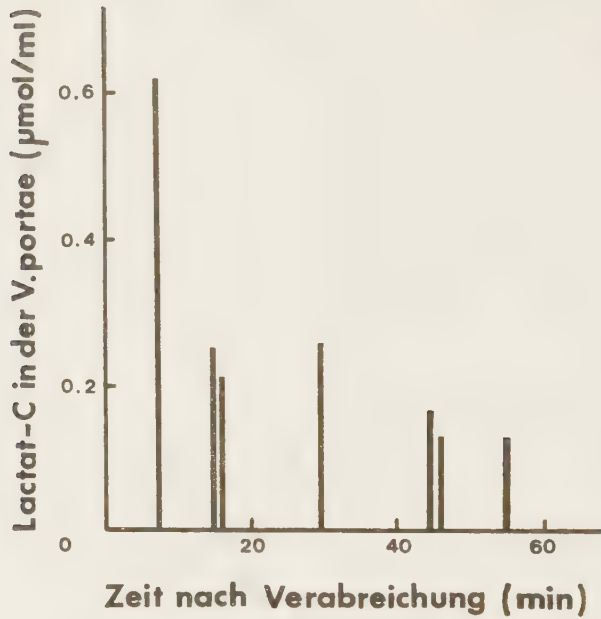


Abb. 4 Abnahme der Lactat-C-Konzentration im Pfortaderblut

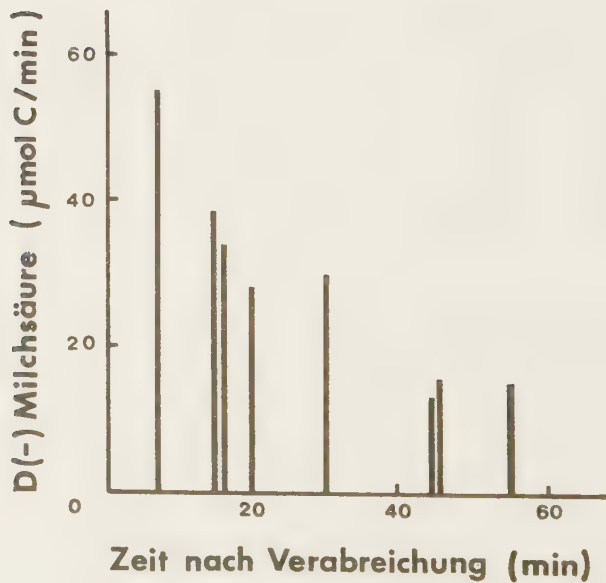


Abb. 5 Abnahme des D(-)-Milchsäureabbaues pro Minute durch Caecotrophe im Magen von Kaninchen

Im Vergleich zur Aorta fanden sich hier 7 Minuten nach der Verabreichung rund 5fach höhere, 15 Minuten nach Applikation dagegen nur noch etwa 2,5fach höhere Konzentrationen C-haltiger Verbindungen aus D(-)-Milchsäure. Nach 30 - 55 Minuten bestand zwischen V. portae und Aorta kein Konzentrationsgefälle mehr. Offensichtlich hatte zu diesem Zeitpunkt die Produktion und damit auch die Resorption mikrobieller Folgeprodukte aus dem Magen einen starken Rückgang erfahren (Tab.8).

3.1.5. Einfluß der Caecotrophe auf die Oxidation von D(-)-Milchsäure. Versuche in vivo.

Die Versuche unter 3.1.4. hatten gezeigt, daß intragastral verabreichte D(-)-Milchsäure unter dem Einfluß von Caecotrophe rasch in andere, möglicherweise intermediär leichter metabolisierbare 14-C-Verbindungen umgewandelt wurde. Daraus leitete sich die Frage ab, welche Rolle die Caecotrophe bei der Beseitigung von D(-)-Milchsäure spielt. Vergleichende Oxidationsmessungen über die $^{14}\text{-CO}_2$ -Exhalation nach peroral verabreichtem (U-14-C)D(-)-Lactat sollten klären, ob D(-)-Milchsäure in Gegenwart von Caecotrophe schneller bzw. besser eliminiert wird, als in deren Abwesenheit. Letzteres war dadurch gegeben, daß die Tiere 8 Stunden vor Versuchsbeginn in einen Käfig verbracht wurden, der bei ungehinderter Wasser- und Futteraufnahme den Kopf fixierte. Zur Feststellung möglicher Unterschiede war ein konstantes und auch ausreichendes Substratangebot von D(-)-Milchsäure nötig, das mit $1,11 \text{ mmol/kg}^{0,75}$ gegeben schien. Nicht auszuschließenden individuellen Differenzen war dadurch entgegengetreten, daß jedes der 4 Tiere beiden Behandlungen unterzogen wurde. Die $^{14}\text{-CO}_2$ -Messung beschränkte sich hier auf 130 Minuten, weil aus den Versuchen unter 3.1.4. hervorgegangen war, daß der mikrobielle Abbau von D(-)-Milchsäure durch die Caecotrophe sehr rasch einsetzte.

Tabelle 9 gibt den zu verschiedenen Zeiten nach Applikation metabolisierten Lactat-C für jedes Versuchstier wieder. In Gegenwart von Caecotrophe wurde von allen Kaninchen innerhalb von 130 Minuten mehr Lactat-C metabolisiert als in deren Abwesenheit (Abb. 6).

Tabelle 8

Konzentration von Lactat-C als Metaboliten in Blutproben von Vena portae und Aorta bei Kaninchen nach peroraler Gabe von (U- 14 -C)D(-)-Lactat

Versuch	Zeit nach Verabreichung (min)	Dosis und Aktivität von D(-)-Milchsäure		Metaboliten im Blut (μ mol L-C/ml)	
		(mmol C)	14 -C (kBq)	SA (kBq/mmol C)	Vena portae Aorta
1	7	0.66	103.5	156.8	0.622 0.124
2	15	0.69	119.3	172.8	0.253 0.129
3	15	0.57	113.3	198.8	0.219 --*
4	20	0.69	104.0	150.8	--* 0.211
5	30	1.05	293.2	279.3	0.255 0.377
6	45	0.63	96.6	153.3	0.160 0.148
7	45	0.81	285.8	352.9	0.129 0.149
8	55	0.90	198.1	120.1	0.130 --*

* keine Blutproben

Tabelle 9

Radation nach peroralen Gaben von D(-)-Milchsäure bei Kaninchen mit und ohne Aufnahme von Caecotrophe^{a)}

Versuchs- nr	Caecotropie	Zeit nach Verabreichung (min)							130	
		10	20	30	40	50	70	90		110
Oxidierte D(-)-Milchsäure (μmol C)										
1	mit	1.46	4.08	35.3	68.9	115	252	445	632	866
	ohne	0.68	2.56	8.56	34.2	59.5	131	232	346	448
	Quotient ^{b)}	2.1	1.6	4.1	2.0	1.9	1.9	1.9	1.8	1.9
2	mit	0.86	2.22	21.3	60.0	111	254	423	592	727
	ohne	1.60	4.90	11.8	45.4	81.8	182	319	439	503
	Quotient ^{b)}	0.5	0.5	1.8	1.3	1.4	1.4	1.3	1.3	1.3
3	mit	1.45	4.28	20.7	45.1	53.8	179	284	421	637
	ohne	1.09	3.89	14.6	34.0	43.5	145	253	409	606
	Quotient ^{b)}	1.3	1.1	1.4	1.3	1.2	1.2	1.1	1.0	1.1
4	mit	0.07	15.0	49.8	97.4	169	345	583	824	1024
	ohne	0.09	2.76	14.1	38.3	72.2	167	286	429	569
	Quotient ^{b)}	0.8	5.4	3.5	2.5	2.3	2.1	2.0	1.9	1.8

^{a)} Dosis 1.11 mmol Lactat/kg ^{0.75}
^{b)} mittlere SA (kBq/mmol C) = 26.9
 Oxidation mit Caecotropie
 Oxidation ohne Caecotropie

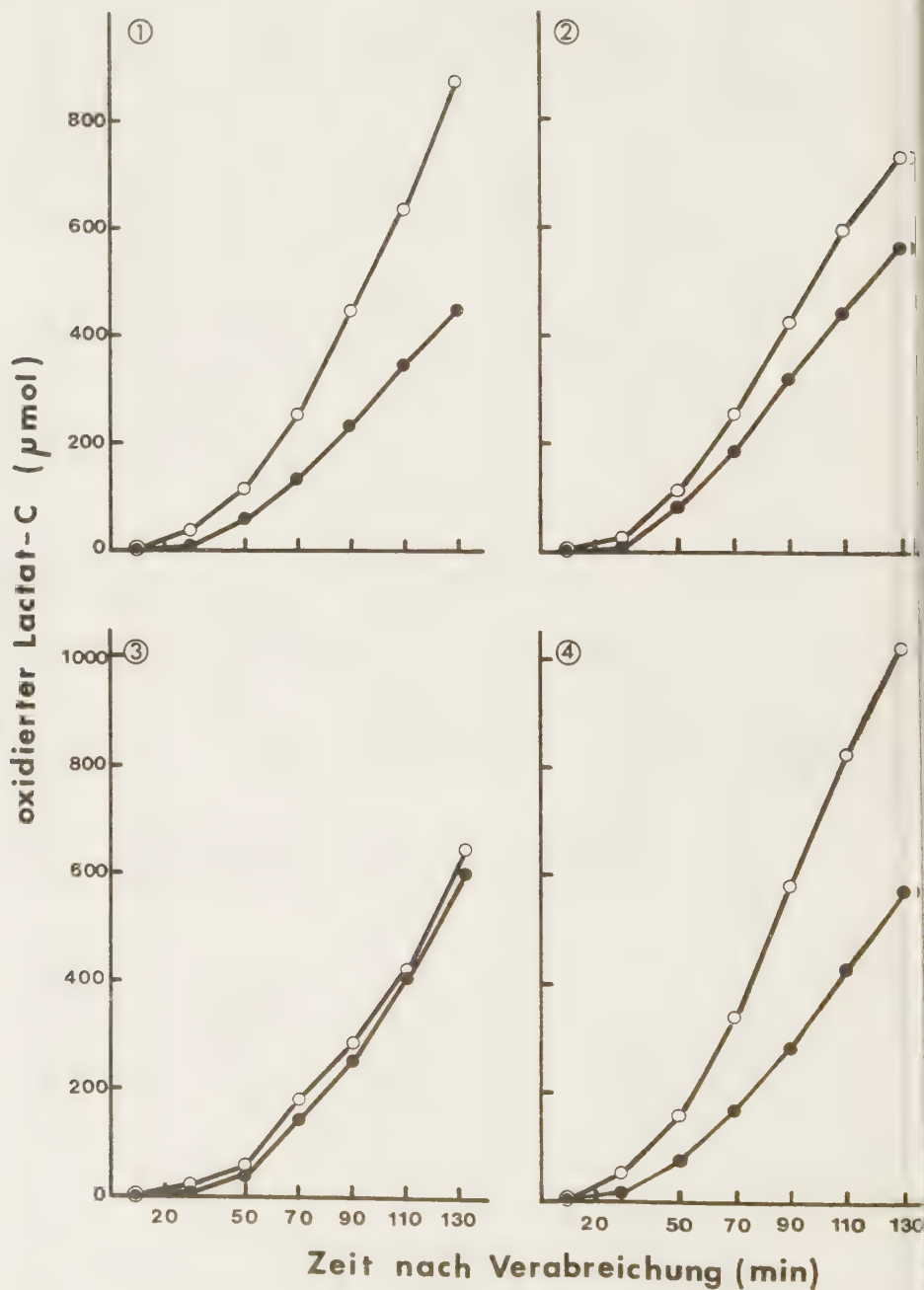


Abb. 6 Oxidation von D(-)-Milchsäure bei Kaninchen nach peroraler Gabe von (U-14-C)D(-)-Lactat (1 - 4 Versuchstiere)

○ nach Aufnahme von Caecotrophe
● ohne Aufnahme von Caecotrophe

Zur quantitativen Darstellung des Unterschiedes zwischen den beiden Behandlungen erscheint in Tabelle 9 die Oxidationsabnahme als Quotient der jeweiligen Werte mit und ohne Caecotrophe. Stärkste Oxidationsunterschiede zwischen den beiden Behandlungen bestanden 20 Minuten (Versuchstier 4) und 30 Minuten (Versuchstier 1,2 und 3) nach Verabreichung. Aber auch schon 10 Minuten nach Applikation wurden von Versuchstier 1 und 2 doppelt bzw. 1,3fach vermehrt Lactat-C exhaliiert. 40 - 130 Minuten nach Verabreichung verblieb, jedes Tier für sich betrachtet, der Oxidationsunterschied entweder konstant, oder es trat ein leichter Abfall ein (Versuchstier 3 und 4). Durchschnittlich wurden ohne Caecotrophe 544 μmol innerhalb von 130 Minuten oxidiert. Dagegen wies die nach dieser Zeit oxidierte Menge in Anwesenheit von Caecotrophe beachtliche Schwankungen innerhalb der Versuchstiere auf. Diese Streuungen waren möglicherweise darin begründet, daß bei den einzelnen Tieren Unterschiede hinsichtlich der Menge an verzehrten Caecotrophepellets bestanden hatten und von daher unterschiedlich viel mikrobiell aktives Material im Magen vorlag. Da stets vermehrte Oxidation von D(-)-Lactat nach Aufnahme von Caecotrophe zu verzeichnen war bestätigten diese Beobachtungen die bereits unter 3.1.4. erhobene Vermutung. Offensichtlich waren durch mikrobiellen D(-)-Milchsäureabbau leichter metabolisierbare Verbindungen im Magen entstanden, die nach Resorption intermediär besser zu CO_2 oxidiert wurden.

Zur ausreichenden Absicherung dieses Befundes erschien eine erneute $^{14}\text{-CO}_2$ -Messung unter gleichen Voraussetzungen, jedoch unter Ausschluß mikrobieller Beteiligung beim Abbau von D(-)-Lactat erforderlich. Es bot sich daher die intraperitoneale Verabreichung gleichermaßen jeweils in Gegenwart bzw. in Abwesenheit von Caecotrophe im Magen an.

Abbildung 7 zeigt die Oxidation von D(-)-Milchsäure als metabolisierter Lactat-C nach i. p. Verabreichung mit und ohne Aufnahme von Caecotrophe. Man sieht, daß unabhängig von Verzehr von Caecotrophe bei 3 von 4 Tieren innerhalb von 130 Minuten annähernd gleich viel oxidiert wurde. Lediglich bei einem Kaninchen wurde bei ungehinderter Caecotropheaufnahme nach diesem Zeitraum etwa 1,3-mal mehr Lactat-C metabolisiert.

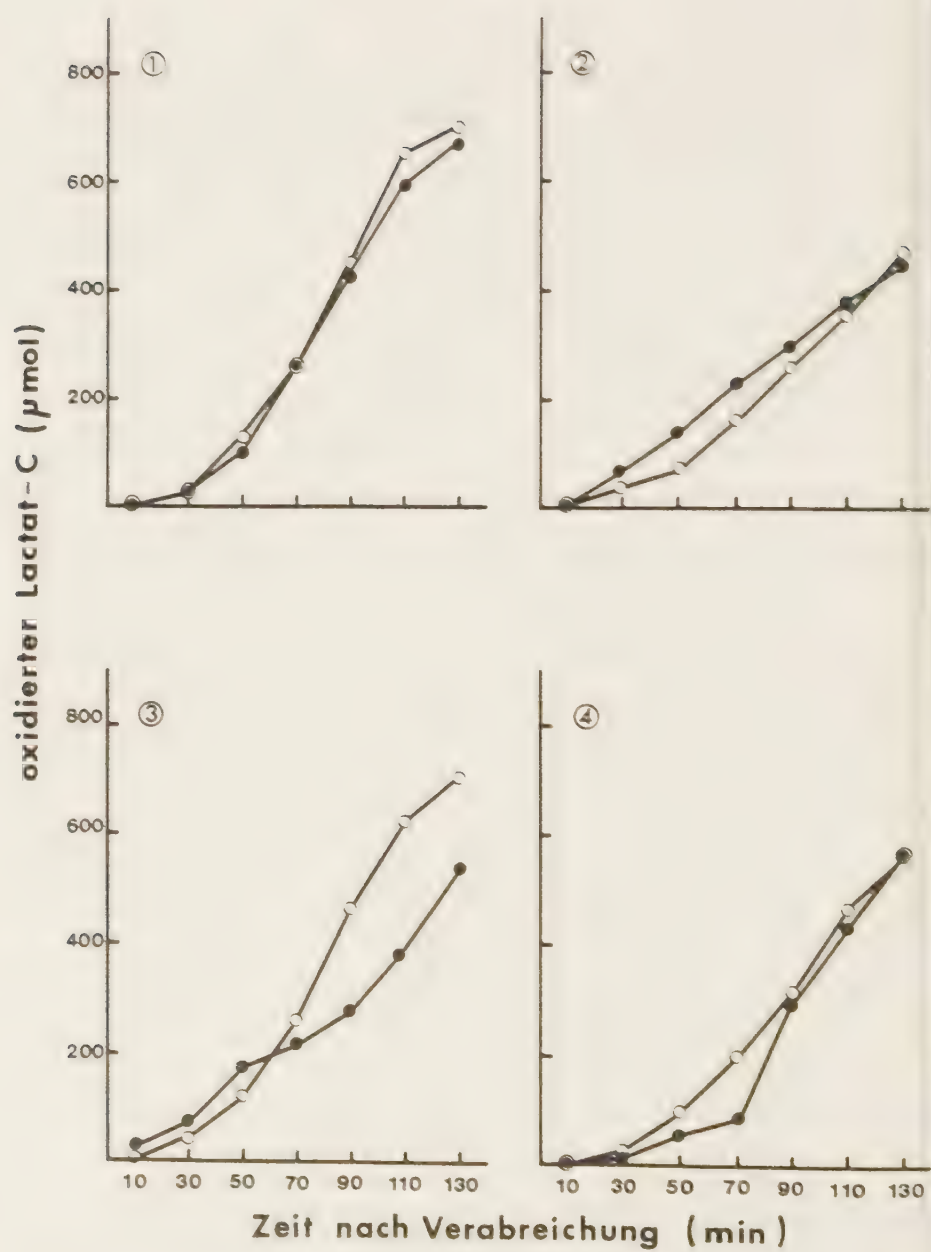


Abb. 7 Oxidation von D(-)-Milchsäure bei Kaninchen nach i. p. Gabe von D(-)-Lactat (1 - 4 Versuchstiere)
 ○ nach Aufnahme von Caecotrophe
 ● ohne Aufnahme von Caecotrophe

Im Gegensatz zu der caecotropheabhängigen erhöhten Oxidation von D(-)-Milchsäure nach peroralen Gaben, trat bei diesem Versuchstier nach i. p. Verabreichung vermehrte Lactat- CO_2 -Exhalation aber erst in der Zeit von 70 - 130 Minuten nach der Verabreichung ein. Für den Zeitraum von 0 - 70 Minuten waren noch fast gleiche Oxidationsraten zu verzeichnen. Man durfte daher annehmen, daß die erhöhte Metabolisierung in diesem Fall nicht auf einen direkten mikrobiellen Einfluß der Caecotrophe zurückzuführen war, weil sich der Unterschied erst relativ spät nach der Applikation bemerkbar machte.

3.2. Versuche zum D(-)-Milchsäurestoffwechsel an Ratten

Die Untersuchungen an Ratten sollten insbesondere die Wirkung hoher peroraler Gaben von D(-)-Lactat auf die Oxidationsrate untersuchen und die renale Exkretion klären. Im Zuge dieser Arbeiten wurde festgestellt, daß im Magen der Ratte beträchtliche Milchsäurekonzentrationen vorkommen und zwar von L(+)- und D(-)-Lactat. Das war bisher nicht bekannt. Wegen der Neuartigkeit des Befundes und seiner Bedeutung für das Gesamtkonzept dieser Studie wird zunächst über den Lactatgehalt im Magen und auch im Aorten- bzw. Herzblut berichtet und danach auf die Stoffwechselversuche eingegangen.

3.2.1. Normalkonzentrationen von Milchsäureisomeren im Magen und Blut

Nach der ersten Beobachtung wurden Untersuchungen an insgesamt 12 Ratten durchgeführt, die alle auf einer Altromin Standard-Diät gehalten waren. Die in Tabelle 10 zusammengefaßten Ergebnisse weisen bei Ratten, mit einem mittleren Körpergewicht von 203 g, einen mittleren Gehalt von $429 \mu\text{mol}$ L(+)- bzw. $300 \mu\text{mol}$ D(-)-Milchsäure und ein Isomerenverhältnis von durchschnittlich 1(L(+)) : 0.77 (D(-)) auf. Im übrigen variierte letzteres mit Werten von 1 : 0.50 und 1 : 1.11 beträchtlich. Diese insgesamt erstaunlich hohen Gehalte an Milchsäure lassen zwar keine Rückschlüsse auf die Fermentationsrate im Magen zu, dürften aber die Anpassung des intermediären Stoffwechsels an D(-)-Lactat nicht unerheblich beein-

Tabelle 10

Milchsäureisomeren im Magen unbehandelter Ratten*

Ratte	Körpergewicht (g)	Milchsäure im Magen (μmol)		Konzentration im Magen ($\mu\text{mol/l}$)		Isomerenverhältnis
		L(+)	D(-)	L(+)	D(-)	
1	205	449	374	77.46	64.56	1 : 0.83
2	181	275	221	57.56	45.95	1 : 0.79
3	202	436	321	60.62	44.58	1 : 0.73
4	202	599	302	88.12	44.33	1 : 0.50
5	225	1022	537	103.01	54.24	1 : 0.53
6	229	447	268	67.72	40.56	1 : 0.59
7	210	455	336	77.15	56.91	1 : 0.74
8	205	427	302	64.65	45.71	1 : 0.71
9	210	343	305	63.44	56.58	1 : 0.89
10	178	113	125	43.66	48.10	1 : 1.11
11	206	308	273	61.60	54.83	1 : 0.89
12	186	277	240	58.94	51.15	1 : 0.87
$\bar{x}$	203	429	300	68.65	50.63	1 : 0.77
$\pm s$	15.6	224	98	15.73	6.94	0.17

* Bei Fütterung einer Altromir. Standarddiät

flussen.

Daher erschien es besonders interessant zu überprüfen, ob sich von diesem beträchtlichen enteralen D(-)-Milchsäure-Pool auch ein Teil im Blut nachweisen ließ. Es stellte sich nach einer enzymatischen L(-)-Milchsäurebestimmung heraus, daß im Herzblut von 5 Ratten eine mittlere Konzentration von $46 \mu\text{mol/l}$ D(-)-Milchsäure gefunden werden konnte, die eine Variation von $29 - 86 \mu\text{mol/l}$ aufwies. Absolut gesehen handelte es sich jedoch nur um sehr geringe Mengen, was daher die Möglichkeit nicht ausschloß, daß unspezifisch reduzierende Verbindungen diese D(-)-Milchsäurekonzentrationen vortäuschten. Es wurde deshalb wie unter 3.1.1., nach Konzentrierung des Blutes eine erneute enzymatische Analyse durchgeführt. Da dazu ein ausreichend großes Probenvolumen erforderlich war, wurde das Blut 5 weiterer Ratten nach Durchtrennung der Aorta gewonnen, und die L(-)-Milchsäurebestimmung fand im Sammelblut dieser Tiere nach Einengung, diesmal um den Faktor 10, statt. Das Analyseergebnis erbrachte eine annähernd 10-fache Extinktionserhöhung, über die sich nach Umrechnung auf das ursprüngliche Volumen eine D(-)-Milchsäurekonzentration von $43 \mu\text{mol/l}$ berechnete. Da aufgrund dieses Befundes die oben gefundenen Blutwerte für D(-)-Milchsäure in ausreichender Weise abgesichert erschienen, wurde D(-)-Lactat als eine physiologischerweise im Blut der Ratte vorhandene Verbindung beurteilt.

3.2.2. Oxidation von D(-)-Milchsäure nach hoher peroraler Dosierung

Von Ratten sind aus der Literatur hohe Ausscheidungsraten von D(-)-Milchsäure nach Gaben von 15 mmol/kg und mehr bekannt, andererseits sehr geringe nach weniger als $5 - 6 \text{ mmol/kg}$. Demzufolge war innerhalb dieses Dosisbereiches eine Erschöpfung der Oxidationsmechanismen zu erwarten. Zur quantitativen Darstellung wurden nach peroralen Gaben von ca. 4, 9 und $13 \text{ mmol (U-14-C)D(-)-Lactat/kg}^{0.75}$ (entspr. etwa 5.55, 1.11 u. 16.67 mmol/kg) die $^{14}\text{-CO}_2$ -Exhalation und Harnausscheidung von $^{14}\text{-C}$ an 3 Gruppen zu je 3 Ratten gemessen. Die über 8 Stunden erhaltenen Werte sind in Tabelle 11 verzeichnet. Innerhalb die-

Tabelle 11

Oxidation von D(-)-Milchsäure bei Ratten innerhalb 480 Minuten nach hoher peroraler Gabe von (U-14-C)D(-)-Lactat

Vers.	Ratten- gruppe	Dosis und Aktivität von D(-)-Milchsäure:		exhaliiert:		maximal oxidiert:		Anteil CO ₂ aus D(-)-Lactat am Gesamt-CO ₂ %
		mmol/kg ^{0.75}	mmol C/kg ^{0.75}	SA*	mmol C/kg ^{0.75}	% der Dosis	mmol/kg ^{0.75}	
1	1	3.84	11.52	10.89	6.01	52.2	2.00	1.86
2	2	4.04	12.12	11.76	3.67	30.2	1.22	1.19
3	3	4.64	13.52	9.69	7.04	50.6	2.35	2.32
	$\bar{x}$	4.17	12.39	10.78	5.57	44.3	1.86	1.79
4	1	8.52	25.56	10.66	9.80	38.3	3.26	3.21
5	2	9.26	27.78	10.59	11.85	42.7	3.95	4.37
6	3	8.65	25.95	4.86	9.83	37.9	3.27	3.45
	$\bar{x}$	8.81	26.43	8.70	10.49	39.6	3.49	3.68
7	1	11.90	35.70	7.48	9.20	28.5	3.07	3.02
8	2	13.40	40.20	7.46	13.59	33.8	4.53	3.64
9	3	13.05	39.15	6.73	11.60	29.7	3.86	4.52
	$\bar{x}$	12.78	38.35	7.22	11.46	30.7	3.82	3.73

* SA = kBq/μmol Lactat-C

ser Meßdauer führte eine ungefähre Verdopplung der Dosis auch zu einer angenäherten Verdopplung der CO_2 -Exhalation aus I(-)-Lactat, eine weitere Dosissteigerung auf insgesamt 3-fache Höhe erbrachte allerdings keine nennenswerte Zunahme der Oxidationsrate. Dementsprechend fiel der Anteil des oxidierten Lactat-C an der Dosis aus. Auch der Beitrag des aus D(-)-Lactat gebildeten CO_2 zur Gesamt- CO_2 -Produktion, der bei der niederen und mittleren Dosis immerhin 2.3 und 4.4 % erreichte, stieg bei der maximalen D(-)-Lactatgabe nicht weiter an. Somit erschien die Oxidationskapazität bei Dosen zwischen 8.8 und 12.8 mmol D(-)-Lactat/kg^{0.75} überschritten zu werden. In der Zeit zwischen 60 und 220 Minuten nach der Verabreichung dürfte die stärkste Anflutung von D(-)-Milchsäure stattgefunden haben. Für diesen Zeitraum wurde der mittlere Minutenfluß des Lactat-C-Umsatzes/kg^{0.75} über die spezifische Aktivität berechnet (Tabelle 12 und Abbildung 8). Die Sättigung der Abbaumechanismen für den Umsatz von D(-)-Lactat wird bereits in diesem Abschnitt in gleicher Weise deutlich.

In Tabelle 13 und Abbildung 9 ist der gesamte Oxidationsverlauf abschnittsweise wiedergegeben. Er wurde in gleicher Weise berechnet, wie bei den Exhalationsmessungen an Kaninchen unter 3.1.2.. Zwischen 180 - 270 Minuten nach der Verabreichung waren in 6 Versuchen (1,4,5,6,8,9) maximale Abbauraten für D(-)-Lactat zu verzeichnen. In drei Versuchen (2,3,7) lagen sie etwas früher zwischen 60 - 180 Minuten nach Verabreichung. Auffallenderweise verlief die Oxidation in den Versuchen 2 und 8 entgegen allen anderen 2-phasig.

Nach 8 Stunden war bei den Ratten die Oxidation von D(-)-Lactat noch nicht abgeschlossen. Sogar im untersten Dosisbereich wurden noch durchschnittlich 8.1 $\mu\text{mol/kg}^{0.75}$ Lactat-C pro Minute metabolisiert. Der Fluß lag zwischen 390 und 480 Minuten in der mittleren Dosierung durchschnittlich doppelt so hoch und in der obersten Dosierung noch rund 1.5-fach höher. Abbildung 9 zeigt, daß in der höchsten Dosierung kein Abfall, sondern eine anhaltende Oxidation von D(-)-Lactat zu verzeichnen war, die noch beträchtlich über die Meßdauer von 480 min hinausreichen mag. Inwieweit es sich bei fortschreitender Versuchsdauer um die direkte CO_2 -Bildung aus D(-)-Lactat oder um

Tabelle 12

Oxidationsraten von D(-)-Milchsäure bei Ratten in der Zeit von 60 - 220 Minuten nach peroraler Gabe von (U-14-C)D(-)-Lactat

Vers.	Ratten- gruppe	Dosis D(-)-Milchsäure mmol C/kg ^{0.75}	Oxidationsrate μmol C/min.kg ^{0.75}
1	1	11.52	17.1
2	2	12.12	12.1
3	3	13.92	24.0
	$\bar{x}$	12.39	17.7
4	1	25.56	27.0
5	2	27.78	28.5
6	3	25.95	21.9
	$\bar{x}$	26.43	25.8
7	1	35.70	25.0
8	2	40.20	28.8
9	3	39.12	23.3
	$\bar{x}$	38.35	25.7

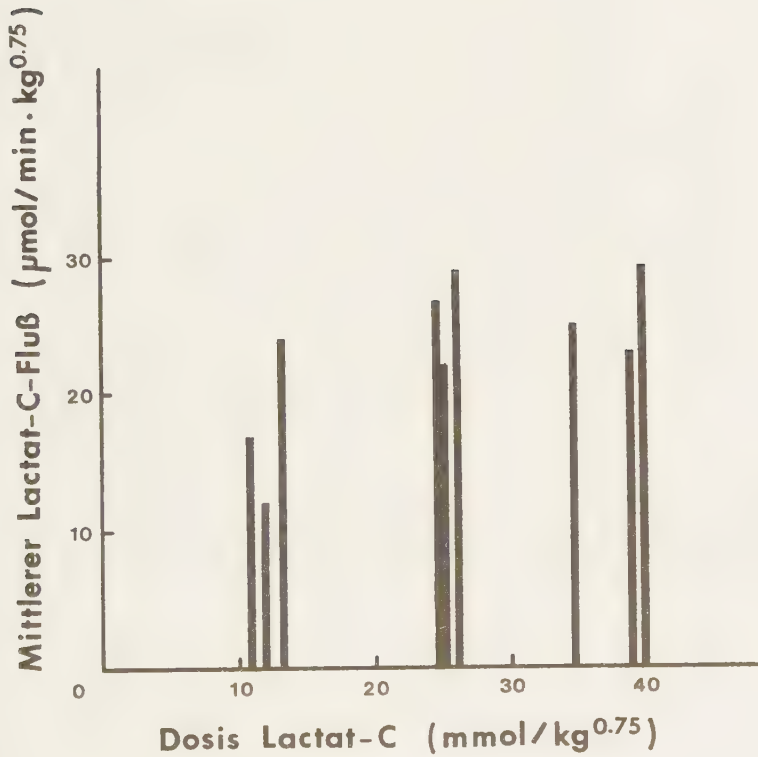


Abb. 8 Mittlere Oxidationsraten von Lactat bei Ratten in der Zeit von 60 - 220 min nach peroraler Gabe von (U-¹⁴-C)D(-)-Milchsäure (gemessen über die ¹⁴-CO₂-Exhalation)

Tabelle 13

Oxidationsverlauf von D(-)-Milchsäure über 480 Minuten bei Ratten nach peroraler Gabe von (U-14-C)D(-)-Lactat

Versuch	Dosis D(-)-Milchsäure $\mu\text{mol C/kg}$	Zeit nach Verabreichung (min)				
		0-20	20-60	60-180	180-270	270-390
				$\mu\text{mol C/min.kg}^{0.75}$		
1	11520	1.7	14.2	17.0	37.5	21.2
2	12120	1.5	8.4	11.9	8.9	6.5
3	13520	3.3	13.4	23.9	21.0	9.9
$\bar{x}$		2.2	12.0	17.6	22.5	12.5
4	25560	3.6	19.9	27.1	25.8	16.9
5	27780	0.7	20.4	28.2	29.4	26.4
6	25950	9.0	11.1	21.0	23.5	20.5
$\bar{x}$		4.4	17.1	25.4	26.2	21.3
7	35700	4.9	12.0	25.9	12.9	16.8
8	40200	8.7	17.1	28.8	29.4	26.5
9	39150	7.9	19.0	21.4	29.3	28.6
$\bar{x}$		7.2	16.0	25.4	23.9	23.9
						390-480
						7.3
						11.7
						5.3
						8.1
						14.6
						20.1
						13.8
						16.2
						16.4
						35.7
						24.5
						25.5

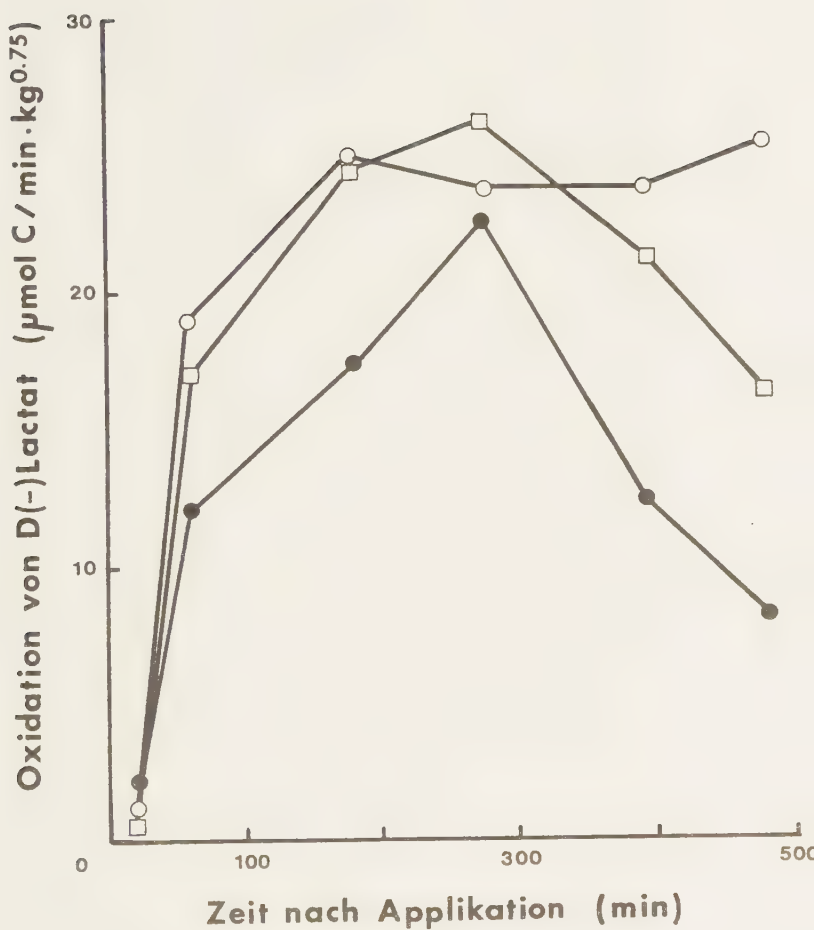


Abb. 9 Oxidationsverlauf von D(-)-Lactat nach peroraler Applikation an Ratten bei unterschiedlichen Dosierungen: 12.78 (○), 8.81 (□), 4.17 (●) D(-)-Milchsäure (mmol/kg^{0.75})

eine indirekte aus Folgemetaboliten (z.B. Glucose) handelt, kann aus diesen Versuchen nicht entnommen werden.

3.2.3. Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im Harn

Nach hoher peroraler Verabreichung von D(-)-Milchsäure lag bei Ratten der Anteil an unverändert mit dem Harn ausgeschiedenem D(-)-Lactat in 7 von 9 Versuchen unter 1 % der Dosis. Lediglich Gruppe 3 schied mehr, nämlich 1.6 % (Versuch 6) bzw. 3.0 % (Versuch 9) der Dosis aus (Tabelle 14).

Da innerhalb jedes Dosisbereiches große Streuungen zwischen den einzelnen Gruppen zu verzeichnen waren, ließ sich keine Beziehung der Ausscheidung zur Dosis herstellen. Nur bei Betrachtung jeder Versuchsgruppe für sich erkennt man vermehrte D(-)-Lactatausscheidung über den Harn nach Erhöhung der Dosis. Mit dem Faktor 32 fiel sie bei Rattengruppe 3 zwischen der untersten und mittleren Dosierung besonders stark auf. Von der mittleren zur höchsten Dosierung dagegen stieg, jede Gruppe für sich betrachtet, die Ausscheidung um das rund 2.5-fache an.

Nur ein geringer Teil des verabreichten Lactat-C erschien, verglichen mit der Gesamt-Lactat-C-Ausscheidung, unverändert im Harn wieder. Jedoch erhöhte sich der Anteil von Lactat-C in Form von D(-)-Milchsäure im Harn nach Erhöhung der Dosis. Von rund 9 % (Versuch 2 und 3) stieg er auf etwa 12 % (Versuch 4 und 5) bzw. 23 % (Versuch 7 und 8) von Gesamt-Lactat-C an. Somit lag der überwiegende Anteil der renalen Ausscheidung von Lactat-C in Form von Metaboliten von D(-)-Milchsäure (z.B. HCO_3^- , Harnstoff, L(+)-Lactat) vor, die nicht näher identifiziert wurden. Allerdings verhielt sich Rattengruppe 3 auch hier wieder anders. Entgegen allen anderen Versuchsgruppen lag überwiegend Lactat-C als D(-)-Milchsäure im Harn vor (Versuch 6: 80.9 %; Versuch 9: 96.5 %). Die Gesamtretention an 14-C-Aktivität wurde durch die Ausscheidung über die Niere nicht wesentlich verändert. Im untersten Dosisbereich lag sie durchschnittlich bei 53.9 %, in der mittleren Dosierung bei rund 58.1 % und in der höchsten bei 69.7 % der verabreichten Lactat-C Menge. Gründe für dieses andersartige Verhalten sind nicht bekannt. Die individuelle Variabilität ist offensichtlich groß.

Tabelle 14

Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im 24-Stundenharn bei Ratten nach peroraler Gabe von (U-14-C)D(-)-Lactat

Vers.	Ratten- gruppe	Dosis mmol C/kg ^{0.75}	Lactat-C der Dosis im Harn (mmol/kg ^{0.75})		% der Dosis L-C im Harn			Retention L-C	
			Gesamt	als D(-)- Milchsäure	als Stoffwech- selprodukte	Gesamt	als D(-)- Milchsäure	mmol/kg ^{0.75}	% der Dosis
1	1	11.52	-*	-	-	-	-	5.51	47.8
2	2	12.12	0.454	0.058	0.396	3.75	0.48	7.99	65.9
3	3	13.92	0.164	0.013	0.151	1.18	0.09	6.72	48.2
4	1	25.56	0.580	0.059	0.521	2.27	0.23	15.18	59.4
5	2	27.78	0.665	0.094	0.571	2.39	0.34	15.27	54.9
6	3	25.95	0.529	0.428	0.101	2.04	1.65	15.59	60.1
7	1	35.70	0.770	0.167	0.603	2.16	0.47	25.73	72.2
8	2	40.20	0.816	0.197	0.619	2.03	0.49	25.79	64.2
9	3	39.15	1.232	1.189	0.043	3.15	3.04	26.32	67.2

* kein Harnabsatz

3.3 Versuche zur renalen D(-)-Milchsäureausscheidung beim Menschen

3.3.1. Ausscheidung von D(-)-Milchsäure über den Harn nach peroraler Dosierung

In dem Humanversuch sollte geklärt werden, wie die Ausscheidung peroral verabreichter D(-)-Milchsäure über den Harn in zeitlicher und quantitativer Hinsicht verläuft. Der Dosisbereich war so gewählt, daß er einerseits einen Vergleich mit den Tierexperimenten zuließ, andererseits um den Wert von 1.11 mmol (100 mg/kg) lag, der von der WHO als "acceptable daily intake" angegeben wird.

Die enzymatische D(-)-Lactatbestimmung im Harn wurde solange durchgeführt, bis in 3 aufeinanderfolgenden Miktionen keine D(-)-Milchsäure mehr nachweisbar war und die Ausscheidung damit als beendet betrachtet werden konnte.

0.55, 1.11 und 1.65 mmol/kg G D(-)-Lactat als DL-Racemat, teilneutralisiert auf pH 4, wurden in Leitungswasser mit etwas Fruchtsaft ad 500 ml gelöst am Vormittag innerhalb von 15 min getrunken. Die einzelnen Personen zeigten darauf unterschiedliche Verträglichkeit. Bei Vp C traten in den beiden untersten Dosierungen Durchfälle auf. Trotz Wiederholung der Versuche waren die Ergebnisse nur mit Vorbehalt zu betrachten, weil ein Teil der verabreichten Milchsäure wahrscheinlich über den Darm eliminiert worden ist und die deutlich geringere ausgeschiedene Menge an D(-)-Lactat im Harn bei dieser Versuchsperson erklärt. Außerdem riefen die über dem ADI-Wert⁺liegenden D(-)-Milchsäuregaben in unterschiedlichem Maße Übelkeit und leichte Benommenheit hervor.

Tabelle 15 zeigt die Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im Tagesharn in % der Dosis, sowie die absoluten Werte bezogen auf die metabolische Körpergröße. Danach wurde von den weiblichen Individuen als Durchschnitt aus allen Versuchen in % der Dosis fast doppelt soviel ausgeschieden wie von den männlichen. Betrachtet man die Ausscheidung in absoluten Werten unter Berücksichtigung des metabolischen Körpergewichtes, so bestanden, wenn man Vp C aus oben genannten Gründen ausklammert,

⁺ ADI = "acceptable daily intake"

Tabelle 15

Ausscheidung von D(-)-Milchsäure im Tagesharn von Versuchspersonen (Vp) nach peroraler Gabe von DL-Lactat

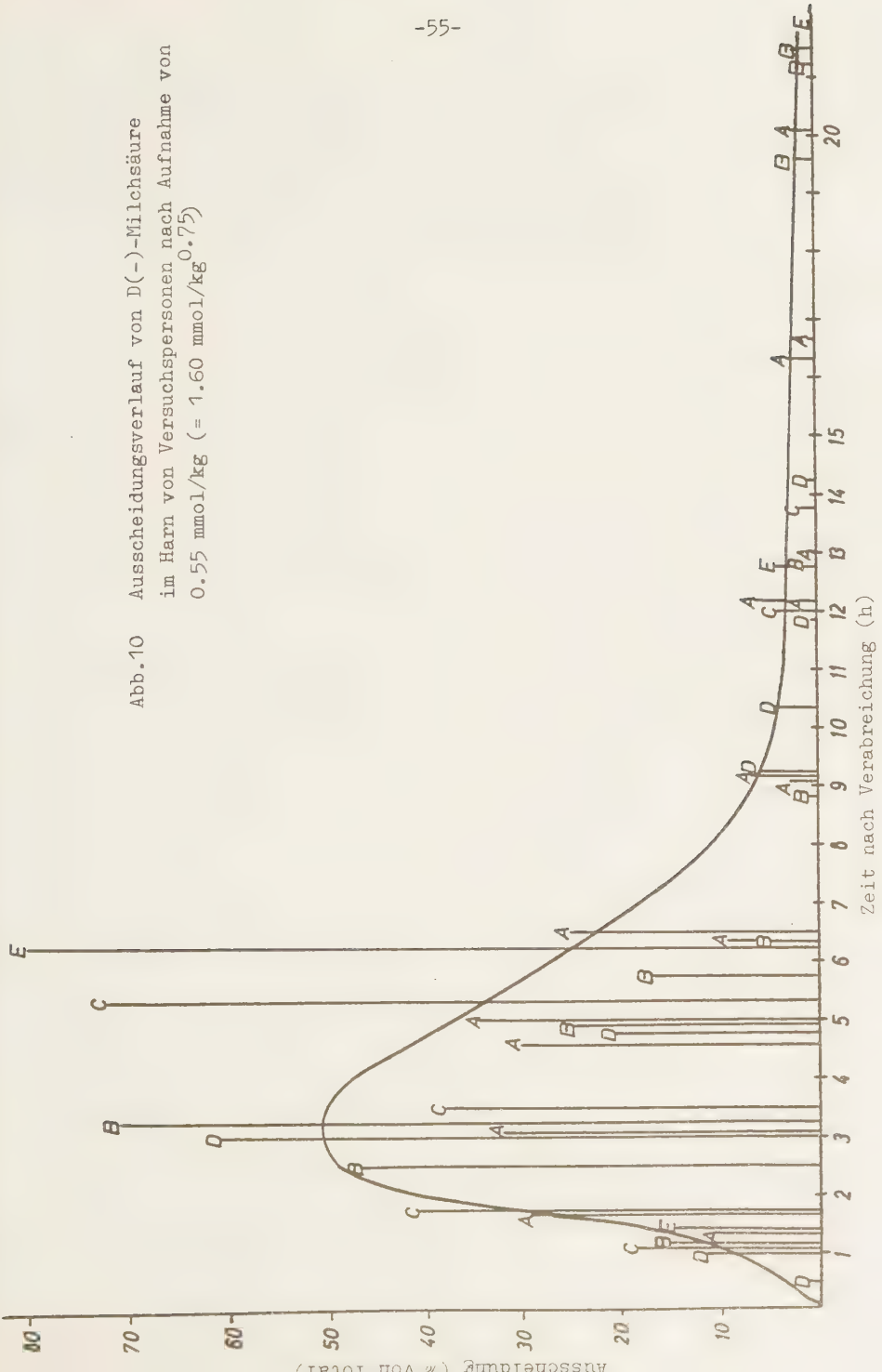
Vp ♂	Dosis D(-)-Milchsäure		Ausscheidung		Vp ♀	Dosis D(-)-Milchsäure		Ausscheidung	
	mmol/kg	0.75	mmol/kg	% der Dosis		mmol/kg	0.75	mmol/kg	% der Dosis
A } C }	0.55	1.63	0.034	2.08	D } B }	0.55	1.56	0.048	3.05
		1.63	0.019 0.011	1.17 0.67			1.57	0.036	2.28
A } C }	1.11	3.26	0.041	1.26	D } B }	1.11	1.59	0.034	2.14
		3.26	0.024 0.027	0.74 0.83			3.11	0.067	2.14
A } C }	1.65	4.89	0.072	1.47	D } B }	1.65	3.13	0.074	2.35
		4.89	0.060	1.22			3.18	0.091	2.87
A } C }	2.22	6.52	0.043	0.66	D } E }	1.65	4.67	0.087	1.87
							4.77	0.053	1.11
				$\bar{x}$ 1.12 SD 0.46					$\bar{x}$ 2.23 SD 0.59

für die unterste Dosierung die geringsten Unterschiede. Bei höherer Dosierung waren dagegen größere individuelle Differenzen zu verzeichnen. Außerdem soll auf 2 Beobachtungen hingewiesen werden. Bei Vp E stieg die Ausscheidung von der niedrigsten zur mittleren Dosierung um das 2.5-fache auf einen Wert von $0.091 \text{ mmol/kg}^{0.75}$ an, der damit alle anderen Werte übertraf. Nach weiterer Dosissteigerung sank dagegen die Ausscheidung um etwas mehr als die Hälfte gegenüber der mittleren Dosierung. Auch bei Vp A, von der ein Einzelwert nach Aufnahme von $2.22 \text{ mmol D(-)-Milchsäure/kg}$ gewonnen wurde, erschien trotz 1.3-facher Dosissteigerung bedeutend weniger D(-)-Lactat im Harn gegenüber der nächstniedrigeren Dosierung. Mit $0.043 \text{ mmol/kg}^{0.75}$ liegt dieser Wert sogar in dem Bereich, der nach Aufnahme von nur 0.55 bzw. $1.11 \text{ mmol D(-)-Milchsäure/kg}$, also wesentlich geringere Mengen, ausgeschieden wurde. Eine Erklärung dafür konnte nicht erbracht werden.

Betrachtet man die Steigerung der D(-)-Milchsäureausscheidung über den Dosisbereich von $0.55 - 1.65 \text{ mmol/kg}$, für den von 4 Vp (A,C,D und E) vergleichbare Werte vorliegen, so führte eine Verdreifachung der Dosis nur zu einem 2-fachen (Vp A) bzw. 1.7-fachen (Vp E) Anstieg der D(-)-Lactatmenge im Harn. Lediglich bei Vp C tritt eine Erhöhung um den Faktor 3.0 ein.

Der zeitliche Verlauf der Ausscheidung, der in Abbildung 10 anhand der untersten Dosierung dargestellt ist, verlief bei allen Versuchspersonen sehr ähnlich. Danach lag die Hauptausscheidungsphase zwischen 0-6 h nach der Verabreichung. Insgesamt 93 % von der Totalausscheidung waren durchschnittlich nach dieser Zeit im Harn nachweisbar. Allerdings erstreckte sich die Ausscheidung von D(-)-Milchsäure bei allen Versuchspersonen noch bis zu 12 h, bei A, B und E noch bis zu 20 h nach der Aufnahme. Auffallenderweise wurden bei Vp C 36 h nach Verabreichung von 0.55 mmol/kg G noch $5.5 \mu\text{mol D(-)-Lactat}$ im Harn nachgewiesen. Dieser Befund dürfte als Ausnahme zu betrachten sein, erscheint jedoch im Zusammenhang mit der bereits erwähnten Unverträglichkeitsreaktion bei dieser Versuchsperson besonders interessant.

Abb. 10 Ausscheidungsverlauf von D(-)-Milchsäure
im Harn von Versuchspersonen nach Aufnahme von
0.55 mmol/kg (= 1.60 mmol/kg^{0.75})



Bei über dem ADI-Wert liegenden D(-)-Milchsäuregaben von 1.65 mmol/kg verzögerte sich die Elimination über die Niere. So konnten 6 h nach Aufnahme durchschnittlich erst 78 % (statt 93 %, s.o.) der Totalausscheidung im Harn festgestellt werden. Jedoch erstreckte sich auch bei dieser Dosierung die Ausscheidung von D(-)-Lactat nicht über 24 h hinaus.

4. DISKUSSION

Obwohl D(-)-Milchsäure seit geraumer Zeit als begrenzt metabolisierbar anzusehen ist (CORI u. CORI, 1929; DRURY, WICK u. MORITA, 1954/55; MEDZIHRADSKY u. LAMPRECHT, 1966), gilt sie als unphysiologisches Isomer. Die Frage nach der funktionellen Bedeutung des für die Oxidation von D(-)-Lactat verantwortlichen Flavinenzym D-2-Hydroxysäuren-Dehydrogenase wurde durch die gründliche Charakterisierung seiner tierartlich verschiedenen Aktivitäten besonders aktuell (CAMMACK, 1969). Eine potentielle Quelle für D(-)-Milchsäure konnte nur in fermentativen Prozessen des Verdauungstraktes gesehen werden, wie sie eben in sehr verschiedener Weise bei einigen Spezies ablaufen. Daraus konnte allerdings noch nicht gefolgert werden, daß intensive Gärungsvorgänge zu starker Lactatproduktion führen, wie man von Wiederkäuern weiß (WALKER, 1968; DUNLOP u. HAMMOND, 1965).

Die Vorgänge sind komplex. Die Zusammenhänge zwischen mikrobieller Verdauung, daraus resultierender Milchsäuresynthese und der Metabolisierung und renalen Ausscheidung waren Gegenstand dieser Untersuchung.

4.1. Physiologische Milchsäurebildung im Magen

Es war bisher bekannt, daß im Zuge von Fermentationsvorgängen des Magens bei einigen Spezies Milchsäure gebildet wird, wobei auch eine gleichzeitige Synthese von D(-)-Lactat angenommen werden darf. Versuche an verschiedenen Tierarten wiesen bereits auf diese Möglichkeit hin, jedoch waren diese Befunde mehr beiläufig. Die speziesabhängigen, grundsätzlichen Unterschiede hinsichtlich der Bedeutung von Milchsäure bei Gärungsvorgängen wurden allerdings bisher noch nicht deutlich genug hervorgehoben. So kann Milchsäure entweder als Intermediär- oder als Endprodukt der Fermentation auftreten. Von daher zeichnen sich unterschiedliche Konsequenzen für den parenteralen Stoffwechsel ab. Trotz rascher Synthese häuft sich D(-)-

Lactat z. B. bei Wiederkäuern nur im Falle einer ernährungsbedingten Stoffwechselstörung (GIESECKE, BARTELMUS u. STANGASSINGER, 1976) im Pansen an. An Ratten wird der Zusammenhang deutlicher. Ihr geringes Magenvolumen, häufige Futteraufnahme und der damit verbundene Luftzutritt verhindern die Ausbildung einer anaeroben, lactilytischen Bakterienflora, wie sie beispielsweise im Pansen gegeben ist. Milchsäure und somit auch D(-)-Lactat häuft sich hier an, weil entsprechende lactatabbauende Mikroorganismen fehlen. Da der Verdauungsprozeß Teil eines physiologischen Vorganges ist, sieht es so aus, als ob von daher auch D(-)-Lactat als physiologische Verbindung beurteilt werden muß. Meßbare Konzentrationen im Blut der Ratte (3.2.1.) als Folge ihrer Gärungsvorgänge lassen Enzyme im Intermediärstoffwechsel vermuten. Auf ähnliche Verhältnisse weisen neuere Versuche an Schweinen hin (WIRTZ u. BICKHARDT, 1977). Umfangreiche Synthese von D(-)- und L(+)-Lactat soll auch im Magen von Ferkeln nach reichlicher Aufnahme von Milch stattfinden (CRANWELL et. al., 1976). Es muß allerdings dahingestellt bleiben, inwieweit die Verwendung von Fisteltieren obige Befunde beeinflußt haben. Beträchtliche Milchsäurekonzentrationen wurden im Kropf des Huhnes nachgewiesen (SZYLIT, 1973), die kontinuierlich dem Intermediärstoffwechsel zugeführt werden. Daneben fanden andere Autoren nicht nur beim Schwein, sondern auch beim Pferd (ALEXANDER u. DAVIES, 1963) einen partiellen bakteriellen Nahrungsabbau mit einhergehender Produktion von Milchsäure. Bei beiden Spezies kann dieses Phänomen auf einen drüsenlosen Abschnitt des Magens zurückgeführt werden. Offenbar begünstigen kutane, cardialwärts gelegene Schleimhautregionen, wie sie sehr umfangreich auch bei Ratten vorkommen (PETERS, 1973; PETERS u. GÄRTNER, 1973), Milchsäuregärungen, weil sich dort aerobe Keime unter guten Lebensbedingungen befinden. Das Zusammentreffen dieser Merkmale bei Tieren mit kohlenhydratreicher Ernährungsweise (siehe Schwein, Pferd, Ratte u. Huhn) läßt ein biologisches Prinzip vermuten, das Fragen hinsichtlich seiner physiologischen Konsequenzen bzw. Vorteile aufwirft. So könnte bei dieser Art der Verdauung ein Schutzmechanismus durch Verdrängung

anderer pathogener Mikroorganismen und Produktion einer für sich konservierend wirkenden Substanz entwickelt worden sein. Außerdem wird bei Fermentation mit Milchsäure als Endprodukt maximaler Energieausnutzung Rechnung getragen, weil gegenüber kurzkettigen Fettsäuren intermediär eine energetisch effizientere Verbindung anfällt (BLAXTER, 1962) und dem Makroorganismus dabei gleichzeitig Vorteile aus bakteriell gebildeten Vitaminen und Proteinen erwachsen. Ähnlich wie bei Ratten (PETERS u. GÄRTNER, 1973) könnten Gärungen auch bei anderen Tierarten eine verlangsamte Nahrungspassage und dadurch eine Art Speicherung von Kohlenhydraten bewirken.

Eine mehr oder weniger starke Anhäufung von Milchsäure wurde auch im Magen von Kaninchen angenommen (GRIFFITHS u. DAVIES, 1963; ALEXANDER u. CHOWDHURY, 1958; HÖRNICKE, 1972). Nach neueren Arbeiten konnte unter in-vitro Bedingungen beträchtliche D(-)-Lactatbildung durch Caecotrophe beobachtet werden. (MACHIEWICZ, 1974; HÖRNICKE u. MACHIEWICZ, 1976). Der Nachweis geringer D(-)-Lactatkonzentrationen im Blut von Kaninchen wurde mit diesen Befunden in Zusammenhang gebracht (PARKER u. MOULD, 1977). Letzteres ließ sich in dieser Arbeit nicht bestätigen (3.1.1.). Da die oben gefundenen Werte für D(-)-Lactat nach eigenen Erfahrungen an der Nachweisgrenze der enzymatischen Bestimmung liegen, haben hierbei möglicherweise unspezifische reduzierende Substanzen D(-)-Lactat-Blutspiegel vorgetäuscht.

Nach eigenen Untersuchungen häuft sich darüberhinaus auch im Magen des Kaninchens D(-)-Lactat nicht an (3.1.1. u. 3.1.4.). Ganz im Gegenteil erfolgt bereits dort ein rascher mikrobieller Abbau (3.1.4. u. 3.1.5.). Somit kommt der von HÖRNICKE und anderen Autoren beobachteten Umsetzung von Milchsäure offensichtlich eine größere Bedeutung zu, als bisher angenommen wurde. Zahlreiche Arbeiten wiesen auf umfangreiche Produktion von kurzkettigen Fettsäuren im Blinddarm des Kaninchens hin (HÖRNICKE, 1972; LENG u. HÖRNICKE, 1975; RUCKEBUSCH u. FIRAMOUTI, 1976; PARKER, 1976), der eine anaerobe, in hohem Maße lactilytisch wirkende Keimflora besitzt (PARKER u. MOULD, 1977). Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Magenfermentationen

der Ratte und des Kaninchens besteht darin, daß diese anaerobe Dickdarmflora bei Kaninchen über die Koprophagie stets nachgeliefert und durch die Bildung von Caecotrophe auch im Magen in ihrer Zusammensetzung nicht verändert wird. An Fisteltieren konnte ein gehemmter Lactatabbau beobachtet werden, der wahrscheinlich auf aerobe Verhältnisse zurückzuführen war. Möglicherweise haben auch bei in-vitro Versuchen diese Faktoren D(-)-Lactatkonzentrationen bedingt (MACHIEWICZ, 1974), wie sie physiologischerweise nicht auftreten (3.1.1.). In vivo zeigte sich (3.1.4. und 3.1.5.) dagegen eine hohe lactilytische Aktivität der Caecotrophe.

Man darf aufgrund dieser bemerkenswerten Ergebnisse annehmen, daß D(-)-Milchsäure im Zuge mikrobieller Vorgänge bei Kaninchen bereits im Magen fermentativ umgesetzt wird und somit nur die Rolle eines Intermediärproduktes spielt.

4.2. Metabolisierung von D(-)-Lactat

Die von CAMMACK (1969) beschriebene D-2-Hydroxysäuren-Dehydrogenase dürfte das Schlüsselenzym zur intermediären Beseitigung von D(-)-Lactat darstellen. Verschiedene Gewebe, in der Hauptsache Leber und Niere, wiesen Enzymkonzentrationen auf, die tierartliche Unterschiede erkennen ließen. Ein tierartlicher Vergleich der Enzymkonzentrationen erfordert jedoch unseres Erachtens den Bezug der Gesamtzymaktivität zur Stoffwechselgröße. Die Berechnung dieser Größe erfolgte über die D-2-Hydroxysäuren-Dehydrogenasengehalte von Leber und Nieren (CAMMACK, 1969) und die durchschnittlichen Organgewichte (entnommen aus: Spector, 1956):

	<u>U*/kg^{0.75}</u>
Ratte	4.49
Kaninchen	3.28
Lamm	2.55
Schwein	2.74
Ochse	2.81

Nach der gewebespezifischen Umsetzung folgt die bestimmte Er-

* 1 Unit (U) nach dem SI-System = 6.67 nkat

wartung eines hohen intermediären Umsatzes von D(-)-Lactat bei der Ratte, was mit dem physiologischen Vorkommen bei dieser Species im Einklang steht.

Die Messung der Metabolisierungskapazität über die CO_2 -Bildung aus D(-)-Milchsäure wurde schon von früheren Autoren durchgeführt, erfolgte jedoch unter ganz unterschiedlichen Versuchsbedingungen, eher im Vergleich zum L(+)-Isomer. Lediglich der Hinweis aus der Literatur, daß D(-)-Milchsäureabbau bei eviszerierten Kaninchen relativ zum L(+)-Lactat 10-mal langsamer (DRURY, WICK u. MORITA, 1954/55), nach Berechnung über die renale Exkretion bei Ratten nur 4-mal langsamer abgebaut wird (CORI u. CORI, 1929), ließ eine tierartlich unterschiedliche intermediäre Behandlung von D(-)-Lactat vermuten.

Vorhandene Meßdaten (FABRITIUS, 1974) über die quantitative und qualitative $^{14}\text{-CO}_2$ -Exhalation nach i. p. Verabreichung von $^{14}\text{-C}$ -markierter D(-)-Milchsäure an Ratten forderten im Rahmen dieser Arbeit heraus, dieselbe Methode bei Kaninchen zur Anwendung kommen zu lassen (3.1.2.).

Die Dosierungen bei Ratten (FABRITIUS, 1974) ließen sich zu 0.39, 1.98 bzw. 4.98 mmol D(-)-Milchsäure/kg^{0.75} berechnen. In den eigenen Versuchen lagen sie in einem durchaus vergleichbaren Bereich (s. Tab. 3).

Bei diesem Stoffwechselvergleich kamen ganz erhebliche tierartliche Unterschiede zutage. Unter gleichen Versuchsbedingungen oxidierten Ratten innerhalb von 6 h durchschnittlich 94, 83 bzw. 88 % zu CO_2 . Bei Kaninchen ergaben sich dagegen Oxidationsraten in einem Bereich von nur 58.8 - 35.1 % der Dosis. Da Ratten demnach innerhalb derselben Zeit bezogen auf die Stoffwechselgröße 2 - 2.5-mal mehr D(-)-Lactat zu CO_2 oxidierten, wird deutlich, daß bei Kaninchen der Abbaumechanismus wesentlich früher erschöpft war. Bei den vorgenannten Dosierungen trat ferner die maximale $^{14}\text{-CO}_2$ -Ausscheidung schon nach 50 - 80 Minuten, bei Kaninchen hingegen erst, abgesehen von der niedrigsten Dosierung, 90 - 160 Minuten auf (s. Tab. 4). Der Abfall der $^{14}\text{-CO}_2$ -Ausscheidung erfolgte bei Ratten wesentlich flacher als in eigenen Versuchen, vermutlich als Folge eines verminderten Substratangebotes, während bei Kaninchen nach rund 300 Minuten trotz erheblicher Retention von $^{14}\text{-C}$ -Aktivität kaum noch $^{14}\text{-CO}_2$ exhaliiert wurde.

Demnach wurde D(-)-Lactat von Ratten rascher und nahezu vollständig einer Endoxidation zugeführt, was mit ihrem relativ hohen

D-2-Hydroxysäuren Dehydrogenasegehalt in Einklang steht. Außerdem dürften die oben genannten Dosierungen nur unwesentlich über der physiologischen D(-)-Milchsäurebelastung der Ratte gelegen haben, denn ihre im Magen gefundenen Konzentrationen (3.2.1.) lassen unter Berücksichtigung der täglichen Futteraufnahme eine Anflutung von D(-)-Lactat in einem Bereich von $1.4 - 4.9 \text{ mmol/kg}^{0.75}$ vermuten. Trotz ähnlicher i. p. Dosierung haben Ratten demnach effektiv bedeutend mehr D(-)-Lactat umgesetzt und so gesehen wird der Unterschied zum Kaninchen hinsichtlich der intermediären Metabolisierung noch gravierender. CORI fand an Ratten nach hohen peroralen D(-)-Lactatgaben erhebliche Mengen im Harn wieder und vermutete daraufhin, daß die Oxidationskapazität für D(-)-Lactat erschöpft sei (CORI u. CORI, 1929). Dagegen konnte hier gezeigt werden (3.2.2.), daß in dieser Dosis, die weit über der bei Kaninchen lag, noch ein beträchtlicher Teil metabolisiert wurde (Tab. 11). Da bis zu einer Dosierung von rund $8.8 \text{ mmol/kg}^{0.75}$ D(-)-Lactat eine eindeutige Steigerung der Oxidation zu verzeichnen war, dürfte das physiologische Maximum der Oxidationsrate bei Ratten in diesem Bereich liegen.

In welchem Maße nach dieser hohen Dosierung 14-C-Aktivität aus D(-)-Lactat in Form von Kohlenhydratverbindungen retiniert wurde, muß differenzierteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Nach früheren Befunden (CORI u. CORI, 1929; HOBERMANN u. D'ADAMO, 1960) ist dieser Anteil im Unterschied zu Wiederkäuern sehr gering (STANGASSINGER, 1976).

Bei Kaninchen sind hinsichtlich der hohen Retention von C-Verbindungen aus D(-)-Lactat, die im Gegensatz zur Ratte schon nach wesentlich geringeren D(-)-Milchsäuregaben zu verzeichnen war, nur Vermutungen zulässig. So muß nach intermediärer Synthese von Pyruvat bzw. Acetyl-CoA der Einbau in Lipid- oder Kohlenhydratverbindungen in Betracht gezogen werden (SAGGERSON, 1974; SMITH, 1975). Andererseits deuten nachweisbare Mengen von D(-)-Lactat im Harn (3.1.3.) relativ lange Zeit nach der Applikation auf die Möglichkeit hin, daß als Folge einer Sättigung der Abbaumechanismen noch beträchtliche Blutspiegel von D(-)-Milchsäure bestanden haben.

Im Gegensatz zu in-vitro Versuchen (MACHIEWICZ, 1974) konnte gezeigt werden, daß die Caecotrophe bereits im Magen für eine schnelle Beseitigung von D(-)-Lactat sorgt (3.1.4.), deren Folgeprodukte intermediär besser oxidiert werden können (4.1.5.). Der einzige Grund weshalb in Anwesenheit von Caecotrophe mehr 14-C aus D(-)-Milchsäure der Endoxidation zugeführt wurde, kann darin zu suchen sein, daß diese 14-C-Aktivität in anderer Form als D(-)-Milchsäure in den Intermediärstoffwechsel trat. Man darf daher annehmen, daß bei Kaninchen aus dem Magen in ähnlicher Weise wie im Blinddarm, vorwiegend kurzkettige Fettsäuren resorbiert werden. Diese Befunde bilden eine Erklärung für die relativ schlechte intermediäre Metabolisierung von D(-)-Lactat bei Kaninchen.

4.3. Renale Ausscheidung von D(-)-Milchsäure

Erste Literaturangaben über die Ausscheidung von D(-)-Lactat im Harn liegen von Ratten vor. Danach wurden innerhalb kurzer Zeit 29 % (CORI u. CORI, 1929) bzw. 23 % (MEDZIHRADSKY u. LAMPRECHT, 1966) peroral verabreichter D(-)-Milchsäure exkretiert. Eigene Versuche, die unter anderem auch in dem Dosisbereich von oben genannter Autoren lagen, ergaben dagegen auch nach i. p. Verabreichung eine maximale Ausscheidungsrate von nur 4 % der Dosis. Diese Ergebnisse stehen mit denen von FABRITIUS (1974) im Einklang, wobei ebenfalls wesentlich geringere Mengen, im Schnitt 3.3 % bei einem Maximum von 8 % der Dosis, im Harn erschienen. Die früher gefundenen Daten dürften daher als überholt anzusehen sein. Wahrscheinlich haben intermediär nicht metabolisierbare Milchsäurepolymere, wie sie bei Verwendung konzentrierter Lösungen auftreten, zu so hohen Werten geführt.

Neuere Versuche haben gezeigt, daß D(-)-Lactat offenbar in gleicher Weise wie L(+)-Milchsäure ein Schwellenstoff zu sein scheint. Tierartliche Unterschiede machten sich bei einem Vergleich zwischen Wiederkäuer und Schwein bemerkbar. So wird D(-)-Lactat bei den erstgenannten bis zu einem Blutspiegel von 1.81 mmol/l (STANGASSINGER, 1976) beim Schwein jedoch nur bis zu 0.2 bzw. 1.0 mmol/l (LINDENA, 1975) vollständig resorbiert. Die Nierenschwelle für D(-)-Lactat von Kaninchen ist

nicht bekannt, dürfte aber nach Versuchen von MÖLLER (1962) eher noch unter der des Schweines liegen. Für D(-)-Milchsäure lagen die Schwellenwerte bei Wiederkäuern und beim Schwein deutlich niedriger als die entsprechenden für L(+)-Lactat, obwohl interessanterweise bei letztgenannter Spezies in Belastungsversuchen für beide Isomere gleiche Metabolisierungskapazität beobachtet wurde (LINDENA, 1975). Man darf annehmen, daß auch bei den hier behandelten Tierarten eine höhere renale Exkretion für D(-)- als für L(+)-Lactat besteht, und die Gründe in der Niere selbst zu suchen sind.

Intraperitoneale D(-)-Lactatbelastung führte bei Kaninchen zu Erhöhung der Harnausscheidung mit steigender Dosis (3.1.3.). Bei Ratten war dieser Effekt dagegen nicht zu verzeichnen (FABRITIUS, 1974), sondern es traten erhebliche individuelle Differenzen auf, die keinen Bezug zur Dosis herstellen ließen. Man muß daher annehmen, daß bei Kaninchen ein andersartiger, wahrscheinlich wirksamerer, dosisabhängiger renaler Eliminationsmechanismus als bei Ratten besteht. Die außerordentliche individuelle Variabilität bei letzteren bestätigte sich in den eigenen Versuchen (3.2.3.) nach hoher peroraler D(-)-Milchsäurebelastung. Möglicherweise spielen bei der Ratte noch andere, unbekannte Faktoren eine Rolle. Interessanterweise lag die durchschnittliche Ausscheidungsrate dabei im gleichen Bereich wie nach rund 6-mal niedrigerer i. p. Gabe.

Was die renale Exkretion von D(-)-Lactat beim Mensch betrifft, so liegen darüber, abgesehen von Versuchen an Säuglingen (DROESE u. STOLLEY, 1964), keine Literaturangaben vor. In dem Dosisbereich von 4 - 4.9 mmol D(-)-Lactat/kg^{0.75} bietet sich aufgrund derselben Applikationsart eine Vergleichbarkeit zur Ratte an. Danach zeichnen sich Differenzen ab, da von den Versuchspersonen bezogen auf die Stoffwechselgröße durchschnittlich doppelt soviel ausgeschieden wurde als von Ratten (vgl. Tab. 14 u. Tab. 15). Eine Dosisabhängigkeit ließ sich beim Menschen nicht in allen Fällen nachweisen. Da Lactat auf die renale Hämodynamik keinen Einfluß hat (MAN et. al., 1969), könnten die von MILLER und MILLER (1949) beobachteten tageszeitlichen Variationen der Nierenschwelle für L(+)-Milchsäure beim Menschen auch bei D(-)-Lactat eine Rolle spielen.

D(-)-Milchsäure dürfte in gleicher Weise wie L(+)-Lactat glomerulär filtriert und tubulär resorbiert werden (CRAIG, 1946; DIES et al., 1969; MAN et al., 1969). Möglicherweise sind stereospezifisch unterschiedliche Transportmechanismen, wie sie an der Blut-Hirnschranke (OLDENDORF, 1973; GJEDDE et al., 1975) bzw. am Dünndarmepithel von Ratten und Kaninchen (HILDMANN et al., 1978; STORELLI et al., 1978) gefunden wurden, für eine geringere Resorptionsrate von D(-)-Lactat verantwortlich zu machen. Andererseits zeigten HÖHMANN et al. (1974), daß die tubuläre Reabsorption von L(+)-Lactat auf dem Wege einfacher Diffusion verläuft. Intrazelluläre Lactatutilisation für Gluconeogenese, die in besonders hohem Maße in der Nierenrinde der Ratte abläuft (KREBS et al., 1963; 1966), wurde für die Bildung eines transtubulären Konzentrationsgradienten verantwortlich gemacht. So gesehen könnte die renale Ausscheidung davon abhängen, in welchem Maße die Niere zur Gluconeogenese aus D(-)-Lactat befähigt ist.

4.4 Allgemeine Schlußfolgerungen

Die hier dargelegten Befunde lassen am Beispiel der Ratte den Schluß zu, daß D(-)-Lactat für einige Spezies eine parenteral physiologischerweise auftretende Verbindung darstellt. Es konnte gezeigt werden, daß über Milchsäuregärungen im oberen Verdauungstrakt dem Intermediärstoffwechsel dieses Isomer kontinuierlich zugeführt wird, sofern aerobe Bedingungen während der fermentativen Verdauungsaktivität gegeben sind. Demzufolge wirkt D(-)-Lactat aufgrund seiner Integration in die Stoffwechselvorgänge der Ratte bei der intermediären Beseitigung auch keine Probleme auf, da entsprechende Enzyme zu seiner Metabolisierung in ausreichender Menge vorhanden sind. Umfangreiche fermentative Beteiligung bei Verdauungsvorgängen führte jedoch nicht zwangsläufig zu ähnlichen Erscheinungen. An Kaninchen ließ sich darlegen, daß bei einer lactilytischen Keimflora, die ein anaerobes Milieu, wie z. B. in der Caecotrophe voraussetzt, D(-)-Milchsäure im parenteralen Stoffwechsel nicht auftritt. Vergleichende Messungen der Oxidation und renalen Ausscheidung ergaben daher für das Kaninchen ein ganz an-

deres Bild. Dessen Probleme bei der intermediären Metabolisierung von D(-)-Lactat ließen sich in einen Zusammenhang mit der ganz unterschiedlichen physiologischen Bedeutung von D(-)-Milchsäure bringen.

Nicht zuletzt sind auch für den Mensch die Überlegungen zum D(-)-Lactat von durchaus praktischem Interesse. Aufgrund der hier an Ratten und Kaninchen dargelegten Befunde, müssen bei der Spezies gleichermaßen als ungeeignetes Stoffwechselmodell für den Menschen beurteilt werden.

Weiterführende Untersuchungen über das D(-)-Isomer der Milchsäure, die unter dem Gesichtspunkt der Vergleichbarkeit mit den Menschen durchgeführt werden, müssen daher bei der Auswahl der Versuchsspezies insbesondere Ähnlichkeiten der Verdauungsphysiologie berücksichtigen.

Ferner konnte diese Studie zeigen, daß der von der WHO empfohlene ADI-Wert für D(-)-Lactat offensichtlich zu hoch angesetzt war. Meßbare Konzentrationen im Harn während der ersten 6 Stunden nach der Aufnahme und auch noch verhältnismäßig lange Zeit danach, ließen auf noch relativ hohe Blutspiegel schließen. Als einzige Erklärung kommt dafür in Betracht, daß D(-)-Milchsäure auch in einem unter dem ADI-Wert liegenden Dosisbereich intermediär nicht ohne weiteres metabolisiert wird.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In Modellexperimenten an Kaninchen, Ratten und Menschen wurden die Beziehungen zwischen D(-)-Milchsäurebildung während des Verdauungsstoffwechsels und ihrer intermediären Metabolisierung bzw. renalen Ausscheidung nach Verabreichung von DL-Milchsäure untersucht, die mit (U-14-C)D(-)-Lactat markiert war.

- Bei Kaninchen tritt D(-)-Milchsäure im Zuge fermentativer Vorgänge im Magen nur als Zwischenprodukt auf, das mikrobiell rasch in andere Verbindungen umgewandelt wird. Im Intermediärstoffwechsel wird D(-)-Lactat nach i. p. Applikation von $0.42 - 2.36 \text{ mmol/kg}^{0.75}$ ($0.44 - 2.22 \text{ mmol/kg}$) zu $58.8 - 35.1 \%$ der Dosis zu CO_2 oxidiert. Die Exkretion im Harn lag bei einem Mittelwert von 2.9% ($0 - 4 \%$) der Dosis, $37.9 - 60.9 \%$ wurden retiniert.
- Bei Ratten ließ sich im Mageninhalt eine mittlere Konzentration von 50.6 mmol D(-)- und $68.7 \text{ mmol L(+)-Milchsäure/l}$ nachweisen. Im Blut traten D(-)-Lactatgehalte von $29 - 86 \text{ umol/l}$ auf. Die Oxidationsrate von D(-)-Milchsäure stieg bis zu einer peroralen Dosis von rund $8.8 \text{ mmol/kg}^{0.75}$ an und erreichte darüber ein Plateau. Die Ausscheidung über die Niere lag durchschnittlich bei 0.8% der Dosis und überstieg auch bei höchster Dosierung nicht 3.0% .
- Bei fünf freiwilligen Versuchspersonen, die $1.56 - 6.52 \text{ mmol/kg}^{0.75}$ ($0.55 - 2.22 \text{ mmol/kg}$) D(-)-Lactat zur peroralen Aufnahme erhielten, trat eine durchschnittliche renale Ausscheidung von 1.7% der Dosis auf. Die Hauptmenge erschien innerhalb von 6 Stunden nach der Aufnahme. Die Ausscheidung erstreckte sich größtenteils über 24 Stunden.

Die Ergebnisse erlauben die Schlußfolgerung, daß D(-)-Milchsäure bei der Ratte als physiologisches Isomer anzusehen ist und Ratte wie Kaninchen als Modelltiere für Stoffwechselversuche mit Milchsäure im Hinblick auf den Menschen ungeeignet sind.

SUMMARY

The relationships between D(-)-lactic acid production during digestion and its intermediary metabolism and renal excretion, respectively, were studied in experiments with rabbits, rats and humans after introduction of DL-lactic acid labelled with (U-14-C)D(-)-lactate.

- In the rabbits D(-)-lactic acid appears in the stomach only as an intermediary product of fermentation and is quickly transformed into other compounds by microorganism. After intraperitoneal injection of 0.42 - 2.36 mmoles D(-)-lactate/kg^{0.75} about 58.8 - 35.1 % of the the doses was oxidized to CO₂. The urinary excretion averaged 2.9 % (range: 0 - 4 %) of the doses, 37.9 - 60.9 % werde retained.
- In the rat the normal concentration of D(-)- and L(+)-lactic acid in stomach contents averaged 50.6 and 68.7 mmoles/l. Blood levels of D(-)-lactate ranged from 29 - 86 μ moles/l. With increasing oral doses of DL-lactate the rate of oxidation of D(-)-lactic acid increased to about 8.8 mmoles/kg^{0.75} and reached a plateau at higher doses. The renal excretion of D(-)-lactate averaged 0.8 % of the doses and did not exceed 3.0 % even with the highest doses.
- In five volunteers who consumed 1.56 - 6.52 mmoles D(-)-lactic acid/kg^{0.75} the average urinary excretion was 1.7 % of the doses. The major portion appeared in the urine within six hours after introduction but the total time for excretion ranged up to 24 hours.

The results obtained allow the general conclusion that D(-)-lactic acid is to be regarded as a physiological isomer in the rat. The rat as well as the rabbit are unsuitable species for model experiments with regard to human D(-)-lactate metabolism.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- ALEXANDER, F. u. A. K. CHOWDHURY, 1958
Digestion in the rabbit's stomach.
Brit. J. Nutr. 12, 65
- ALEXANDER, F. u. E. DAVIES, 1963
Production and fermentation of lactate by bacteria
in the alimentary canal of the horse and pig.
J. Comp. Path. Ther. 73, 1
- ALUS, G. u. N. A. EDWARDS, 1977
Development of the digestive tract of the rabbit
from birth to weaning.
Proc. Nutr. Soc. 36, 3A
- BARKER, S. B., 1957
In: Methods in enzymology, Bd. III (S. P. Colowick
u. N. O. Kaplan)
Academic Press. Inc., Publishers New York
- LE BARS, H. u. G. DEMAUX, 1966
Quelques problèmes posés par la coprophagie physiologique du lapin, place de l'acide lactique dans la nutrition.
- BAUCHOP, T. u. R. W. MARTUCCI, 1968
Ruminant like digestion of the Langur monkey.
Science, 161, 698
- BLAXTER, K. J., 1962
The energy metabolism of ruminants.
Verlag Hutchinson Scientific and Technical, London
- BOLTON, W., 1965
Digestion in the crop of the fowl.
J. Poultry Sci. 6, 97

BONNAFOUS, R. u. P. RAYNAUD, 1968

Mise en évidence d'une activité lysante du colon proximal sur les microorganismes du tube digestif du lapin.

Arch. Sci. 22, 57

BRAY, G. A., 1960

A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in liquid scintillations counter.

Anal. Biochem. 1, 279

BRIN, M., R. E. OLSON u. F. J. STARE, 1952

Metabolism of cardiac muscle.

V. Comparative studies with L(+)- and D(-)-¹⁴C lactate in duck and rat tissues.

J. Biol. Chem. 199, 467

BRITTEN, J. S., 1968

Enzymic estimation of D-malate and other D-2-hydroxy acids.

Anal. Biochem. 24, 330

BRÜGGEMANN, J. u. D. Giesecke, 1968

Milchsäuregehalte im Pansen und mikrobieller Abbau in vitro.

Zbl. Vet. Med. A 15, 470

BUFFONI, B. u. F. BLASCHKO, 1963

Enzymatische Oxidation von Aminoketonen im Säugetierplasma.

Experientia 19, 421

CAMMACK, R., 1968

Spontaneous activation of D-2-hydroxy acid dehydrogenase of rabbit kidney.

Biochem. J. 109, 46

CAMMACK, R., 1969

Assay, purification and properties of mammalian
D-2-hydroxy acid dehydrogenase.

Biochem. J. 115, 55

CORI, C. F. u. G. T. CORI, 1929

Glycogen formation in the liver from d- and
l-lactic acid.

J. Biol. Chem. 81, 389

CRAIG, F. N., 1946

Renal tubular reabsorption, metabolic utilisation
and isomeric fractionation of lactic acid in the dog.

Am. J. Physiol. 146, 146

CRANWELL, D. P., D. E. NOAKES u. K. J. HILL, 1976

Gastric secretion and fermentation in the suckling
pig.

Brit. J. Nutr. 36, 77

CRISTIE, A. u. P. D. CRANWELL, 1976

Lactic acid utilization by the baby pig.

Proc. Nutr. Soc. 35, 27 A

DAKIN, H. D. u. H. W. DUDLEY, 1913

On glyoxalase.

J. Biol. Chem. 14, 423

DÍES, F., G. RAMOS, E. ALVELAR u. M. LENNIHOFF, 1969

Renal excretion of lactic acid in the dog.

Am. J. Physiol. 216, 106

DROESE, W. u. H. STOLLEY, 1964

Funktionelle Gesichtspunkte bei der Beurteilung von
Milchmischungen für den jungen gesunden Säugling.

Medizin und Ernährung 8, 169

- DRURY, D. R., A. N. WICK u. T. N. MORITA, 1954/55
Metabolism of lactic acid in extrahepatic tissues.
Am. J. Physiol. 179/180, 345
- DRURY, D. R. u. A. N. WICK, 1965
Chemistry and metabolism of L(+)- and D(-) lactic acid.
Am. N. Y. Acad. Sci. 119, 1061
- DUNLOP, R. H. u. P. B. HAMMOND , 1965
D-lactic acidosis of ruminants.
Am. N. Y. Acad. Sci. 119, 1109
- EDEN, A., 1940
Coprophagie in the rabbit: origin of "night faeces".
Nature 145, 628
- ELLIOT, K. A. C., 1960
Methylglyoxal formation from aminoacetone by ox plasma.
Nature 185, 467
- FABRITIUS, A., 1974
Die Metabolisierung und Ausscheidung von D(-)-Milchsäure - Versuche an Ratten mit spezifischen biochemischen Methoden.
Vet. Med. Diss., München
- FONTY, G., 1974
Etude qualitative et quantitative de la microflore digestive du lapin holoxénique à différents niveaux du tube digestif et en fonction de l'âge effect de l'allaitement artificiel et du régime alimentaire.
Diss., Faculté des Sciences exactes et naturelles, Clermont-Ferrand

GIESECKE, D., C. BARTELMUS u. M. STANGASSINGER, 1976
Untersuchungen zur Genese und Biochemie der
Pansenacidose 3.

Zbl. Vet. Med. A 23, 353

GJEDDE, A., B. EKLÖF u. J. ANDERSON, 1975
Brain uptake of lactate, antipyrine, water and
ethanol.

Acta physiol. scand. 93, 145

GONET, Ph., G. FONTY u. Y. RIOU, 1976
La microflore digestive du lapin. Variations
avec d'age et l'aliment d'allaitement.

Proc. of the 1st. Internat. Rabbit Congress,
Dijon (France) Com. 34

GRIFFITHS, M. u. D. DAVIES, 1963
The role of the soft pellets in the production
of lactic acid in the rabbit stomach.

J. Nutrition 80, 171

HARPER, H. A., 1973
Review of Physiological Chemistry, 14th Edition
Lange Medical Publications, Los Altos, California

HENNING, S. J. u. F. J. HIRD, 1972
Diurnal variations in the concentrations of vola-
tile fatty acids in the alimentary tract of wild
rabbits.

Brit. J. Nutr. 27, 57

HILDMANN, B., H. LÜCKE, M. BARAC-NIETO u. H. MURER, 1978
Lactate-sodium cotransport in rabbit small intestinal
brush border membranes.

Abst. Europ. Intestinal Transport Group, 2nd Meeting
Abstr. 32

HOBERMANN, H. D. u. A. F. D'ADAMO jr., 1960

Coupling of oxidation of substrates to reductive biosynthesis.

III. L- and D-lactates.

J. Biol. Chem. 235, 514

HOHORST, H. J., K. GAWEHN u. H. U. BERGMAYER, 1970

L-Lactat: Bestimmung mit LDH und NAD, S. 1425

In H. U. Bergmeyer:

Methoden der enzymatischen Analyse.

2. Auflage, Band II

Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße

HOLTEN, C. H., 1971

Lactic acid.

Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße

HÖHMANN, B. H., P. P. FROHNERT, R. KUME u. K. BAUMANN, 1974

Proximal tubular lactate transport in rat kidney:

A micropuncture study.

Kidney International, 5, 261

HÖRNICKE, H., 1972

Neuere Befunde über Blinddarmfunktion und

Caecotrophie bei Kaninchen.

Z. Tierphysiol., Tierernährg. u. Futtermittelk. 30, 121

HÖRNICKE, H. u. A. MACKIEWICZ, 1976

Production d'amylase décomposition de l'amidon et formation des acides D- et L-lactiques par les caecotrophes.

Proc. of the 1th Internat. Rabbit Congress,
Dijon (France) Com. 56

KAMETAKA, M., 1973

Mikrobiologie der Verdauung beim Kaninchen.

In D. Giesecke u. H. K. Henderickx:

Biologie und Biochemie der mikrobiellen Verdauung,
S. 283

BLV Verlagsgesellschaft, München-Bern-Wien

KANDLER, O., 1973

In Eichholtz: "Die biologische Milchsäure"

Ergänzung zur 2. Auflage, S. 65

Eden - Stiftung

KOCH, G., M. LEDINEK u. D. GIESECKE, 1972

Untersuchungen über die Beteiligung von Mikro-
organismen am Verdauungsstoffwechsel des Schweines.

Z. Tierphysiol., Tierernährg. u. Futtermittelk., 30, 222

KREBS, H. A. et al., 1963

Renal gluconeogenesis: The effect of diet on the gluco-
neogenetic capacity of rat-kidney-cortex slices.

Biochem. J. 86, 22

KREBS, H. A. et al., 1966

The fate of isotopic carbon in kidney cortex
synthesizing glucose from lactate.

Biochem. J. 101, 242

LENG, E. u. H. HÖRNICKE, 1975

Tagesrhythmische Unterschiede in der Zusammensetzung
des Blinddarminhaltes von Kaninchen.

Z. Versuchstierk. 17, 285

LINDENA, J., 1975

Untersuchungen zur Kinetik des Lactat-Stoffwechsels
beim Hausschwein.

Vet. Med. Diss., Hannover

LOCKWOOD, L. B. u. D. E. YORDER, 1965

Lactic acid.

I. Chemistry and enzymology of lactate isomers.

Am. N. Y. Acad. Sci. 119, 854

LONG, G. L. u. N. O. KAPLAN, 1968

D-lactate specific pyridine nucleotide lactate dehydrogenase in animals.

Science 162, 685

MACKENZIE, D. D. S., 1967

Production and utilization of lactic acid by the ruminant. A review.

J. Dairy Sci. 50, 1772

MACHIEWICZ, A., 1974

In-vitro-Versuche zur Bedeutung der Caecotrophe für den Stärkeabbau und die Bildung von D- und L-Lactat im Magen des Kaninchens.

Diplomarbeit, Hohenheim

MAN, N. K. et al., 1969

Über den Mechanismus der renalen Lactatbearbeitung beim Menschen.

Klin. Wschr. 47, 1170

MARVER H. S., D. P. TSCHUDY, 1966

The determination of aminoketons in biological fluids.

Anal. Biochem. 14, 53

MEDZIHRADSKY, F. u. W. LAMPRECHT, 1966

Stoffwechseluntersuchungen mit Essig-, Milch- und Citronensäure.

Z. Lebensmittelunters. u. Forsch. 130, 171

MEYERHOF, O. u. L. LOHMANN, 1926

On respiration and carbohydrate utilization of animal tissue.

Biochem. Z. 171, 421

MILLER, A. T. jr. u. J. O. MILLER jr., 1949

Renal excretion of lactic acid in exercise.

J. Appl. Physiol. 1, 614

MÖLLER, J. V., 1962

The effects of D- and L-lactate and osmotic diuretics on uric acid clearance in the rabbit.

Acta physiol. scand. 54, 30

OLDENDORF, W. H., 1973

Carrier- mediated blood-brain barrier transport of short-chain monocarboxylic organic acids.

Am. J. Physiol. 224, 1450

OHWAKI, K. et al., 1974

Stomach fermentation in east african Colobus monkeys in their natural state.

Appl. Microbiol. 27, 713

PARKER, D. S., 1976

Turnover of volatile fatty acids in the caecum of the rabbit.

Proc. of the 1st. Internat. Rabbit Congress,
Dijon (France), Com. 51

PARKER, D. S. u. A. J. MOULD, 1977

The metabolism of lactic acid in the large intestine of the rabbit.

Proc. Nutr. Soc. 36, 5 A

PETERS, K. u. K. JÄRTNER, 1914

Untersuchungen zur Funktion des Vormagens der Muriden. I.

Zbl. Vet. Med. A 20, 255

PETERS, K., 1914

Untersuchungen zur Funktion des Vormagens der Muriden. II.

Zbl. Vet. Med. A 20, 789

RUCKENBUSCH, Y. u. J. PIRACONTI, 1976

Sur le déterminisme de la caecotrophie chez le lapin.

Proc. of the 1st. Internat. Rabbit Congress, Dijon (France), Com. 64

SACHS, L., 1972

Statistische Auswertungsmethoden.

Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

SCHIMASSEK, H., 1965

Lactate metabolism in the isolated perfused rat liver.

Ann. N. Y. Acad. Sci., 119, 1015

SMITH, H. W., 1965

The development of the flora of the alimentary tract in young animals.

J. Path. Bacteriol. 90, 495

SMITH, S., 1976

Lipogenesis in the rabbit adipose tissue.

J. Lipid Research 16, 394

SPECTOR, W. S., 1956

Handbook of biological Data.

W. B. Saunders Company, Philadelphia u. London

STANGELINGER, M., 1976

Die Stoffwechselkinetik von D(-)Milchsäure
bei Wiederkäuern.

vet. Med. Diss., München

STREIBEL, G., K. GÖBELER u. G. LIEKE, 1976

L-lactate uptake in intestinal brush border vesicles.

Abstr. Europ. Intestinal Transport Group, 2nd Meeting

Abstr. 57

STUBBINS, W., 1967

Urinary excretion of aminoaceton following
administration of L-threonine.

Recond. J. Clin. Lab. Invest. 20, 29

THOMEL, P. u. D. LAMART, 1976

Changes in the volatile fatty acid level in the
rabbit caecum.

Proc. of the 7th Internat. Rabbit Congress,
Bijon (France) Com. 57

WYLLIE, O., 1975

Les voies métaboliques de la dégradation de l'amidon
dans le jabot de Gallus Gallus et leurs incidences
nutritionnelles.

Diss. Faculté des Sciences, Paris

TURBE, P. K., 1969

The metabolism of D-hydroxy acids in animal tissues.

Ann. N. Y. Acad. Sci., 119, 920

URATA u. GRANICK, 1961

Aminoaceton formation and decomposition in the liver.

Biochem. Biophys. Res. 20, Com. 4

WALKER, D. J., 1968

The position of lactic acid and its derivatives in the nutrition and metabolism of ruminants.

Nutr. Abstr. Rev. 38, Nr. 1, 1

WARNROCK, L. G., R. E. KOEPPE, N. F. INCIANE u. W. E. WILSON, 1965

L(+)- und D(-) lactate as precursors of muscle glycogen.

Ann. N. Y. Acad. Sci. 119, 1048

WHO (World Health Organization) technical Report, 1967

373, 27

WIESNER, H. U., H. STAHLHUT-KLIPP u. J. BENNER, 1975

Zum Vorkommen von D-Laktat in Sauermilch, Joghurt und Kefir.

Archiv für Lebensmittelhygiene 26, 41

WILLIAMS, V. J. u. D. D. S. MACKENZIE. 1965

The absorption of lactic acid in the reticulo-rumen of the sheep.

Aust. J. Biol. Sci., 18, 917

WIRTZ, A. u. K. BICKHARDT, 1977

Zum Ruhe-Lactatstoffwechsel bei nüchternen und gefütterten Schweinen.

Z. Tierphysiol., Tierernährg. u. Futtermittelk. 39, 146

Der Leitung des Institutes danke ich für die gewährten Arbeitsmöglichkeiten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Dieter Giesecke für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung und wissenschaftliche Anregung für das Gelingen dieser Arbeit.

An dieser Stelle möchte ich auch Herrn Prof. Dr. E. Scharrer, Herrn Dr. Stangassinger, Frau Dr. R. Günzel und Herrn Dr. L. Brunnberg für die freundliche Beratung danken.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau S. Wiesmayr für ihr entgegenkommendes Interesse bei den technischen Problemen dieser Arbeit.

LEBENS LAUF

Perdita v. Wallenberg	geb. am 26. August 1952 in Detmold/NRW
Eltern	Dr. Eckart v. Wallenberg Rechtsanwalt und Notar Christa v. Wallenberg geb. Grosse
Schul Ausbildung	von 1958 - 1962 an der Lutherschule in Bielefeld von 1962 bis zur Reife- prüfung im Mai 1972 am Cecilien-Gymnasium in Bielefeld
Universitätsausbildung	Studium der Veterinärmedizin von 1972 - 1973 an der Tier- ärztlichen Hochschule Hannover und von 1973 - 1977 an der Universität in München 1978 Staatsexamen
gegenwärtige Tätigkeit	seit Januar 1979 als wissen- schaftliche Hilfskraft am In- stitut für Physiologie, Physiologische Chemie und Er- nährungsphysiologie im Fach- bereich Tiermedizin der Universität München

